



TITLE:

苔類ゼニゴケにおける光周性生長 相制御の分子機構の解析(Digest_要約)

AUTHOR(S):

久保田, 茜

CITATION:

久保田, 茜. 苔類ゼニゴケにおける光周性生長相制御の分子機構の解析.
京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18533>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2018-08-22に公開

苔類ゼニゴケにおける光周性生長相制御の分子機構の解析

久保田 茜

目次

要旨	2
略語一覧	3
序論	5
結果	16
考察	31
材料と方法	36
結論	44
引用文献	46
論文目録	54
謝辞	55

要旨

植物は日長を感知することで季節の変化を認識し、最適な季節に栄養生長相から生殖生長相への相転換を行う。このような日長依存的な生長相転換、あるいは光周性生長相転換は、陸上植物において広く観察されるものの、その分子機構の解析は一部の植物種に限定されるため、陸上植物の光周性生長相制御機構の普遍性や多様性については未解明な点が多い。そこで本研究では、基部陸上植物に属する苔類のうち、日長と光質による生長相転換が明確に観察されるゼニゴケをモデルとして、陸上植物の光周性生長相制御機構の進化過程の解明を試みた。

まず、ゼニゴケの長日条件依存的な生長相転換制御機構を明らかにするために、被子植物の光周性花成経路において主要な役割をもつ *GI*, *FKF1* 遺伝子のゼニゴケオルソログ *MpGI* および *MpFKF* の機能解析を行った。*MpGI* および *MpFKF* の発現は概日時計によって制御されており、ともに夕暮れの時間帯に発現ピークを示すことが示された。また、*MpGI* と *MpFKF* はゼニゴケの葉状体で広く共発現することが示唆された。酵母ツーハイブリッド法および共免疫沈降法を用いた解析により、*MpGI* と *MpFKF* は相互作用することが示された。このことから、ゼニゴケの配偶体において *MpGI*-*MpFKF* 複合体が形成されることが示唆された。さらに、*MpGI* と *MpFKF* のノックアウト株 *gi^{ko}*, *fkf^{ko}* は長日条件依存的な生殖器官形成が完全に抑制された。このことから *MpGI*-*MpFKF* 複合体が、ゼニゴケの生長相転換に必要であることが示唆された。また、*MpGI* と *MpFKF* の過剰発現系統では、野生株で生殖器官形成がみられない短日条件においても生殖器官形成がみられた。これらより、*MpGI*-*MpFKF* 複合体がゼニゴケの生長相転換を促進することが示唆された。ただし、*MpGI*, *MpFKF* の過剰発現系統では、光質による生長相制御は野生株同様に維持されていたため、*MpGI*-*MpFKF* 複合体を介した日長依存的な生長相制御機構は、光質による制御機構とは独立しており、これらの統合点は *MpGI* および *MpFKF* の下流に位置すると考えられた。さらに、*MpGI* はシロイヌナズナ *gi* 変異体の遅咲きの表現型を相補できることから、*MpGI* は孢子体世代においても生長相制御因子として機能し得ることが示唆された。これらの結果により、*GI*-*FKF1* を介した光周性生長相制御機構は、陸上植物の進化上普遍的に保存された分子機構であることが示唆された。

以上を合わせて、概日時計から *GI*-*FKF1* 複合体を介した光周性生長相転換制御機構は、苔類、つまり植物の陸上化の時点ですでに獲得されており、植物は進化過程でこの分子機構を配偶体世代から孢子体世代へと転用したと考えられた。

略語一覽

a.a.: amino acid
ABA: abscisic acid
AD: activation domain
bp: base pair
BD: binding domain
CCFL: cold cathode fluorescent lamp
cDNA: complementary DNA
CDS: coding sequence
Col: Columbia
CT: circadian time
DNA: deoxyribonucleic acid
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EST: expressed sequence tag
FMN: flavin mononucleotide
FR: far-red light
GUS: β -glucuronidase
HPT: hygromycin phosphotransferase
IP: immunoprecipitation
kb: kilo base pair
kDa: kilo dalton
ko: knockout
LED: light-emitting diodes
MES: 2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate
miR: micro RNA
NOS: nopaline synthase
ORF: open reading frame
OX: overexpression
PAGE: poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR: polymerase chain reaction
PHY: PHYTOCHROME
pro: promoter
qPCR: quantitative PCR
RNA: ribonucleic acid
RT: reverse transcription

SD: standard deviation

SDS: sodium dodecyl sulfate

SEM: standard error of mean

Tak-1: Takaragaike-1

Tak-2: Takaragaike-2

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

UTR: untranslated region

WT: wild type

X-Gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt

ZT: zeitgeber time

序論

植物の光周性生長相制御

植物を取り巻く環境は、時間の移り変わりとともに絶えず変化する。植物はこのような環境変化を敏感に感知するだけでなく、植物それ自身がもつ概日時計を利用して変化を予測し、それに備えることで安定的に環境に適応する。このような環境応答のうち、特に 1 日の昼の長さ（日長）に応じた生理応答を光周性と呼ぶ。光周性応答は入力系・概日時計・出力系の 3 つの段階から構成されている。まず、光シグナルや温度シグナルなどの外部環境が受容体に受容され、環境情報が「入力」される。入力された情報は「概日時計」に伝達され、概日時計が規定する時間軸に統合されることで、植物は 1 日のうちどの時間帯（位相）に入力がおこなわれたかを把握できるようになる。このようにして感知された時間情報に応じて、下流の遺伝子発現が変動することで、「出力系」の生理応答が引き起こされる。日長は温度のような環境情報と比較すると、規則的に繰り返される変化であるため、植物にとって自身の生育環境や季節を正確に把握するのに有用な環境情報であると考えられる。従って光周性は植物のライフサイクルを通じて様々な生理応答を制御する (de Montaigu et al., 2010)。

光周性が制御する生理応答のうち、最も重要な生理応答の一つが栄養生長から生殖生長への生長相転換である。植物の光周性生長相制御の研究は 1920 年の Garner と Allard によるタバコの光周性花成の発見に端を発する (Garner and Allard, 1920)。その後、光周性花成の研究が様々な植物種において展開されたが、現在では長日植物のモデル植物シロイヌナズナを中心としてその分子機構の解明が進められてきている。その結果、葉で感知された日長情報が、長日条件依存的に花成促進因子である *CONSTANS(CO)* の発現を誘導することで花成が誘導されることが明らかとなった (Song et al., 2013)。CO は維管束篩部伴細胞において花成ホルモンである *FLOWERING LOCUS T(FT)* の転写を誘導し、FT の翻訳産物が茎頂に輸送されることで花成が引き起こされることが明らかとなった (Corbesier et al., 2007; Notaguchi et al., 2008)。

日長依存的な生長相制御機構は、被子植物における花成以外に、コケ植物における生殖器官形成など、陸上植物に共通して起こる生理応答であることが古くから報告されている (Wann, 1925; Voth and Hamner, 1940; Benson-Evans, 1961, 1964)。しかし、その分子生物学的な解析は被子植物の一部の植物種に限定的であり、生長相転換の分子機構が進化上普遍的に保存されているかどうかは、全く明らかにされていない。

概日時計

植物の概日時計は、複数のフィードバック転写制御から構成されている。被子植物のモデル植物シロイヌナズナの概日時計は、Myb 転写因子である *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* や *CIRCAIAN COLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)*、二成分制御系のレスポンスレギュレータから機能分化した *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR) /TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1)* 遺伝子群、既知の機能ドメインをもたない核タンパク質 *GIGANTEA (GI)*、3つの転写因子 EARLY FLOWERING (ELF) 3, ELF4, LUX ARRHYTHMO (LUX) から構成される Evening Complex (EC) を主要な構成因子とする複数のフィードバックループが連動するモデルが提唱されている (Nakamichi, 2011; Nagel and Kay, 2012; Pokhilko et al., 2012, 図 I)。

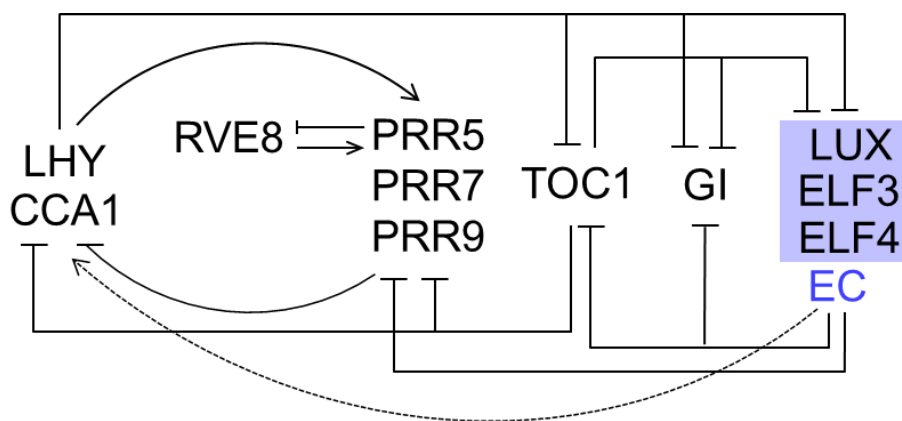


図1 シロイヌナズナにおける概日時計の分子ネットワーク (Nagel and Kay, 2012; Pokhilko et al., 2012 に基づいて作成)

矢印は促進を、Tバーは抑制を示す。シロイヌナズナの概日時計は、複数のポジティブ・ネガティブフィードバックループが連動することにより、一定の周期をもつ安定した自律振動を生み出していると考えられる。実線は直接的、点線は間接的な制御を示す。

時計因子の大半の分子実体は転写因子であり、1 日の中の様々な時間帯で互いの発現を制御しあうことにより特定の周期のリズムを生み出し、自律的に継続させることができる。まず、夜明けになると、LHY および CCA1 が *PRR9*, *PRR7* のプロモーターに直接結合し、その発現を誘導する (Farre et al., 2005, 図 II A)。PRR9、PRR7、PRR5 は反対に *LHY*, *CCA1* のプロモーター上に結合することでその発現を抑制する (Nakamichi et al., 2010, 図 II B)。一方 LHY、CCA1 は *TOC1*, *LUX*, *ELF3*, *ELF4*, *GI* などの転写を直接または間接的に抑制することが示唆されている (Alabadi et al., 2002; Hazen et al., 2005; Kikis et al., 2005; Li et al., 2011; Nusinow et al., 2011)。従って、日中から夕方にかけて PRR9、PRR7、PRR5 の発現が上昇して LHY、CCA1 の蓄積量が減少してくると、*TOC1*, *LUX*, *ELF3*, *ELF4* 遺伝子の発現抑制が解除され、発現が上昇する (図 II B)。こうして発現が誘導された *ELF3*, *ELF4* は *LUX* と EC を形成し (Nusinow et al., 2011)、*PRR9*, *PRR7* のプロモーターに結合して転写を抑制する (Helfer et al., 2011; Chow et al., 2012, 図 II C)。*ELF3*, *ELF4* は、既知の DNA 結合ドメインをもたないため、おそらく GARP 型転写因子である *LUX* を介して標的因子の発現に影響を与えていると考えられている (Chow et al., 2012)。これにより LHY および CCA1 は、発現抑制が解除され、夜明けに向けて発現量が上昇する (図 II C)。この他にも、LHY/CCA1 と同じ Myb 転写因子である REVEILLE (RVE) 8 は PRR5 と (Rawat et al., 2011, 図 I)、機能未知の核タンパク質 LIGHT-REGULATED WD1 は PRR9 とフィードバックループを構成することが示唆されている (Wu et al., 2008; Wang et al., 2011)。また転写因子以外にも、FIONA1 のような機能未知の核タンパク質も、これらの時計遺伝子と相互作用して概日リズムの周期の維持に関与することが明らかにされつつある (Kim et al., 2008)。転写のフィードバック制御に加えて、*TOC1* のタンパク質レベルの制御が概日リズムの維持に大きな影響を与えていることも明らかにされている (Mas et al., 2003)。このように被子植物では概日時計の分子機構は非常に複雑であるため、数理モデルを用いた手法などにより、その分子ネットワークの解明が試みられているものの (Pokhilko et al., 2013)、その全容解明には至っていない。

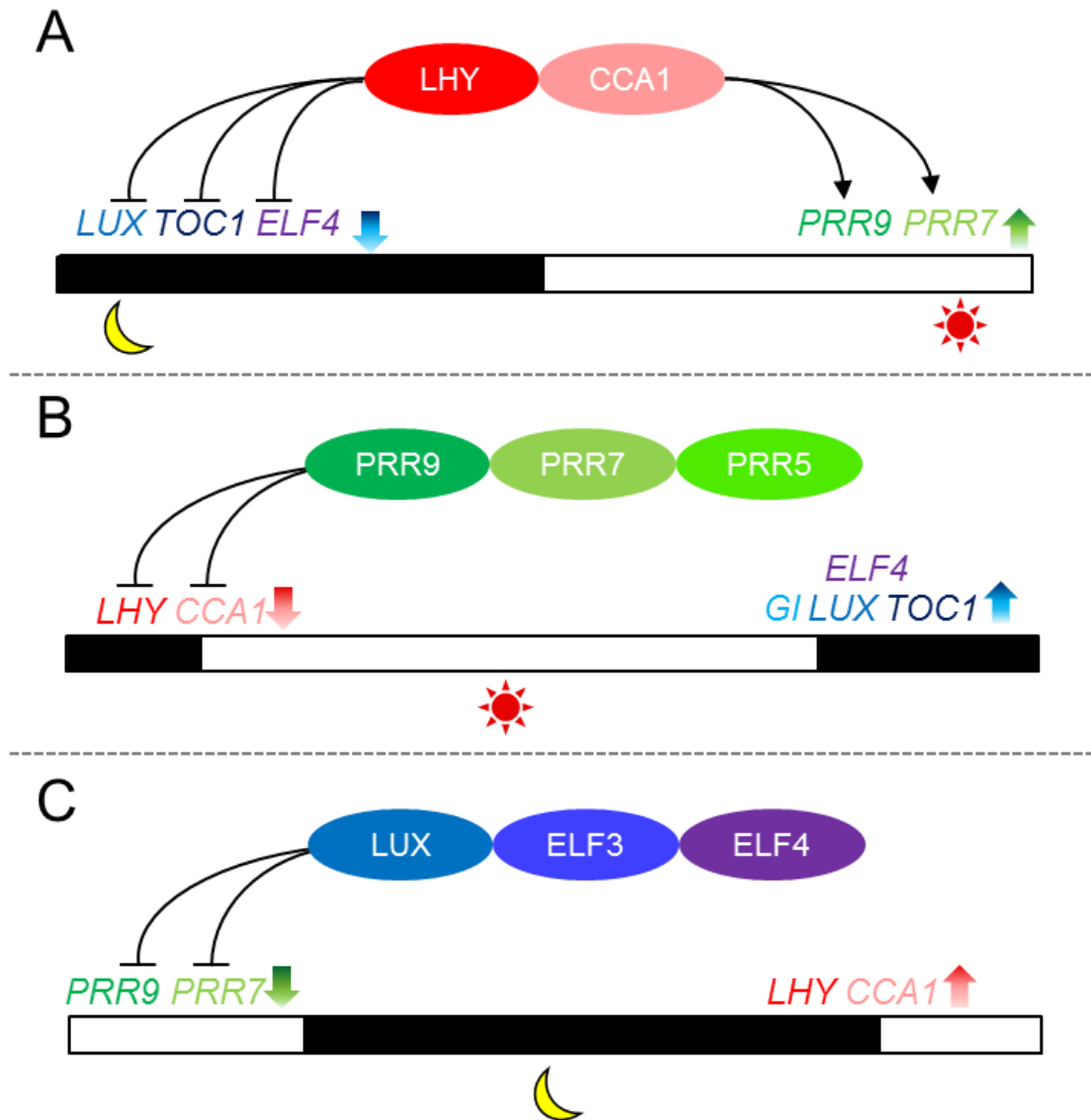


図 II シロイヌナズナにおける概日時計の転写制御のモデル (Nakamichi, 2011 に基づいて作成)
 夜明け (A)、日中 (B)、夕暮れ (C) において主に発現している時計遺伝子を介した制御を示す。(A) LHY/CCA タンパク質は *LUX*、*TOC1*、*ELF4* のプロモーター上に結合して転写を抑制すると同時に *PRR9*、*PRR7* のプロモーター上に結合し、転写を促進する。(B) *PRR9*、*PRR7*、*PRR5* は連続的に *LHY/CCA1* のプロモーター上に直接結合することで日中を通じて *LHY/CCA1* 遺伝子の発現を抑制する。(C) *LUX*-*ELF3*-*ELF4* から構成される EC は *PRR9*、*PRR7* のプロモーター上に結合して転写を抑制する。

GI と FKF1 による光周性花成制御

概日時計から花成制御をつなぐ出力系経路において、最も重要な役割をもつのが GI と FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX (FKF1) である。GI は、遅咲きの突然変異体の原因遺伝子として単離された (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999)。GI は明らかな機能ドメインを持たない 127 kDa の核タンパク質をコードしている遺伝子で、その遺伝子発現は概日時計により制御されている。GI の mRNA および GI タンパク質の蓄積量は、長日条件では日の出から 8~10 時間後にピークを示す (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999) (図 III)。また、夜間には CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 (COP1)-ELF3 複合体を介したプロテアソーム分解系による分解制御を受ける (Yu et al., 2008)。

FKF1 は遅咲きの表現型を示す変異体の原因遺伝子として単離・同定された (Nelson et al., 2000)。FKF1 タンパク質は、青色光受容体フォトトロピンの光受容ドメインとしても知られる Light, Oxygen, Voltage (LOV) ドメインを N 末端側に、E3 ユビキチンリガーゼとして機能するうえで重要である F-box ドメインを中央に、そして C 末端側に kelch リピータードメインを有する。FKF1 遺伝子の発現は概日時計により制御されている。FKF1 の mRNA および FKF1 タンパク質の蓄積量は GI と同様に、長日条件では日の出から 10~13 時間後にピークを示す (Nelson et al., 2000; Imaizumi et al., 2003)。長日条件においては、GI と FKF1 のタンパク質蓄積量のピークが一致することに加え、GI と FKF1 が青色光依存的に複合体を形成する (Sawa et al., 2007)。GI-FKF1 複合体は CO の転写抑制因子である CDF (CYCLING DOF FACTOR) 1、CDF2、CDF 3、CDF 5 をユビキチン化し、プロテアソーム系による分解に導くことで、夕方に CO の転写抑制を解除する (Imaizumi et al., 2003; Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007; Fornara et al., 2009)。一方短日条件では GI、FKF1 タンパク質の蓄積量ピークが一致しない。これに加え、GI と FKF1 の蓄積量がピークを迎える時間帯に光が当たらないため、青色光依存的な複合体が形成されず、CDF の分解は起こらない (Sawa et al., 2007)。このように、GI-FKF1 による光周性花成制御は、内性の概日時計 (内的符合) と外部からの光刺激 (外的符合) の 2 重の制御を受けていると考えられている (図 III)。

GI, FKF1 ホモログは、被子植物において広く存在しており (Hayama et al., 2002; Hong et al., 2010; Taylor et al., 2010; Li et al., 2013)、なかでも GI を介した花成制御機構は、被子植物の様々な植物種で保存されているが (Zhao et al., 2005; Hecht et al., 2007; Higuchi et al., 2011; Watanabe et al., 2011; Bendix et al., 2013)、緑色植物の進化上基部に位置するブラシノ藻オストレオコッカス (*Ostreococcus tauri*) や緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)、蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) においては、そのホモログが存在しない。このことから、GI-FKF1 による生長相制御機構の起源は維管束植物の出現と前後していると考えられてきた (Holm et al., 2010)。

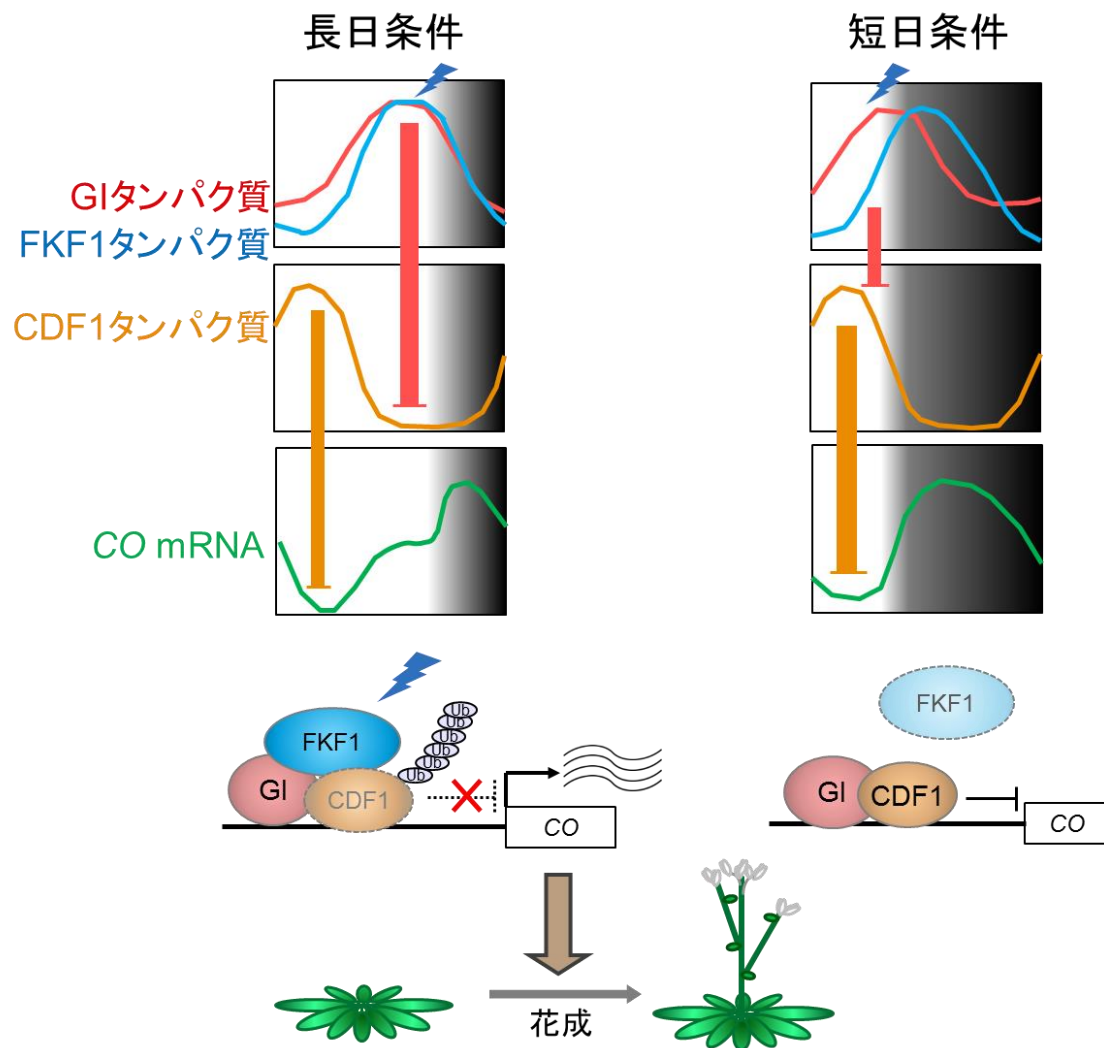


図 III シロイヌナズナにおける GI-FKF1 複合体を介した光周性花成経路 (Sawa et al., 2007 に基づいて作成)

グラフは GI タンパク質、FKF1 タンパク質、CDF1 タンパク質、CO mRNA の蓄積量変化の模式図。長日条件の夕方では、CO プロモーター上の GI-FKF1 複合体が CDF1 タンパク質をユビキチン化して分解すると考えられるが、短日条件では GI-FKF1 複合体の形成量が少ないため、CDF1 は分解されないと考えられる。

緑色植物の進化と光周性

緑色植物進化の基部系統にあたる植物での概日時計の研究は、オストレオコッカスやクラミドモナス、ヒメツリガネゴケを中心として進められてきてきた (McClung, 2013)。これらの緑藻やコケ植物においては、時計遺伝子の数や種類が被子植物に比べて少なく、中心振動体の分子機構も比較的単純であると考えられている (表 1)。従って、植物は進化の過程でループを複雑化させることでより頑強かつ柔軟な概日時計を発達させてきたと考えられる。

表 1 陸上植物及び藻類のモデル生物における概日時計および光周性花成に関与する遺伝子の分子種 (Holm et al., 2010 に元づいて作成)

		緑藻 <i>O. tauri</i>	蘚類 <i>P. patens</i>	小葉類 <i>S. moellendorffii</i>	被子植物 <i>A. thaliana</i>
<div>LHY/CCA1</div> <div>RVE</div> <div>PRR</div> <div>TOC1</div> <div>LUX</div> <div>ELF3</div> <div>ELF4</div>	1	2	2	2	
		3	3	9	
	1	4	2	4	
		0	1	1	
	2	1	1	5	
	0	2	3	1	
	0	1	2	1	
GI	0	0	2	1	
FKF1/LKP2/ZTL	0	0	2	3	

シロイヌナズナの *LUX* 遺伝子に関しては、概日時計への関与が示された 2 分子種に加え (Hazen et al., 2005; Onai and Ishiura, 2005; Dai et al., 2011; Helfer et al., 2011)、3 分子種のホモログが確認されている (Hazen et al., 2005)。

プラシノ藻オストレオコッカスの概日時計は、シロイヌナズナの時計遺伝子と相同性を持つ TOC1 と CCA1 による単一のフィードバックループで構成される最もシンプルな制御システムをもつ (Corellou et al., 2009)。数理モデリングと合わせた手法により、TOC1 と CCA1 の転写フィードバックループに加え、光が各遺伝子の転写・翻訳産物の安定性を調節すること、さらにその効果が特定の時間帯に限定されることが、概日リズムの頑強性や柔軟性に必要であることが明らかにされている (Troein et al., 2011)。概日時計からの出力系に関しては、細胞分裂および細胞周期関連因子の発現が光および概日時計の制御下にあることが報告されているが、概日時計がどのようにして細胞周期関連因子の発現を制御するのか、詳しい分子機構は明らかになっていない (Moulager et al., 2007; Moulager et al., 2010)。

これに対し緑藻クラミドモナスは、走行性や細胞分裂などの生理応答が概日時計により制御されることが古くから報告されてきた (Bruce, 1972)。しかし、クラミドモナスの概日時計の分子機構は、他の植物種とは異なり、独自に進化したものである可能性が示唆されている。これまでに単離された約 30 個の時計遺伝子には、被子植物の時計遺伝子と共通した DNA 結合ドメインをもつもののそれ以外の領域の保存性が低い転写因子様タンパク質や、他の生物の時計遺伝子とまったく相同性を示さない RNA 結合タンパク質などが含まれている (Matsuo et al., 2008)。従って、クラミドモナスは種分化の後に独自に概日時計の分子機構を進化させたと考えられている。

基部陸上植物における先行研究では、蘚類ヒメツリガネゴケの概日時計は、中心振動体として *LHY/CCA1* ホモログが概日リズム形成に中心的な役割を果たすことが示されており (Okada et al., 2009a; Okada et al., 2009b)、オストレオコッカスと同様、*LHY/CCA1* と *PRR* 遺伝子群によるシングルループで構成されるモデルが提唱されている (Holm et al., 2010)。出力系に関しては、光合成関連因子である *Lhcb* や葉緑体遺伝子の転写に関わるシグマ因子の発現が、概日時計の支配下にあることが報告されている (Aoki et al., 2004; Ichikawa et al., 2004; Ichikawa et al., 2008)。また、ヒメツリガネゴケの生殖器形成は、短日条件と温度により誘導されることが報告されている (Hohe et al., 2002)。ただし、前述のとおりヒメツリガネゴケには *GI*, *FKF1/LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2)/ZEITLUPE (ZTL)* のオルソログが存在しないことから、概日時計からの出力系は被子植物における *GI-FKF1* とは異なることが予想されている (Holm et al., 2010)。

このように、緑色植物の進化において陸上化の前後に位置する生物種では、概日時計の中心振動体は存在するが、*GI*, *FKF1* のような出力系に位置する遺伝子のオルソログの存在はこれまでに報告されていない。従って、植物の陸上化に伴い、概日時計からの出力系、特に光周性応答までの一連のシグナル伝達機構が、いつ生じ、進化の過程で保存されてきたどうかは明らかにされてこなかった。

基部陸上植物ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)

ゼニゴケが属する苔類は基部陸上植物の代表的な現生系統であり、植物の進化上非常に重要な位置を占める (Qiu et al., 2006; Bowman et al., 2007, 図 IV)。従ってゼニゴケは、植物が陸上化した際に獲得していたシグナル伝達機構を保持していると期待され、陸上植物の進化を考えるうえで非常に有用なモデル植物であると考えられる。

ゼニゴケは、生活環の大半を葉状体と呼ばれる配偶体 (n) 世代で過ごす(図 V)。これは、孢子体世代 ($2n$) が優占なシダ植物以降の植物種とは対照的な生活環である (図 IV)。葉状体は栄養生長相においては杯状体の内部に無性芽と呼ばれる 1 細胞由来のクローンを形成し無性的に増殖するが、生殖生長相に移行すると多細胞の造精器または造卵器をもつ雌雄の生殖器官を発達させる。受精により生じる孢子体 ($2n$) は、完全に配偶体に従属しており、世代期間も減数分裂を経て孢子を形成するまでの間であり、ゼニゴケの全生活環において非常に短い。成熟した孢子は吸水すると分裂・分化を開始し、再び葉状体へと生長していく(図 V)。このようにゼニゴケは半数体世代優占の生活環をもつため、形質転換体の表現型を当代で解析できるという特長をもつ。加えて葉状体は根・茎・葉のない比較的単純な体制をもつため、発生・形態形成・環境応答などに関して比較的単純なシグナル伝達機構をもつことが期待される。

また、ゼニゴケは分子遺伝学を行う上での基盤が整備されている。これまでに、パーティクルガンを用いた核ゲノムおよび葉緑体ゲノムへの形質転換法 (Takenaka et al., 2000; Chiyoda et al., 2007) が確立されている。近年、アグロバクテリウムによる高効率な核ゲノムへの形質転換法 (Ishizaki et al., 2008; Kubota et al., 2013; Tsuboyama and Kodama, 2014) が確立された。また、相同組み換えを利用した遺伝子ターゲッティング法や (Ishizaki et al., 2013)、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集の手法が確立しつつある (Sugano et al., 2014)。ゲノム情報に関しても、様々な光条件や発生段階に由来する EST 情報に加え (Nagai et al., 1999; Nishiyama et al., 2000; 大和ら、未発表)、Joint Genome Institute (JGI) によるゲノム解読プロジェクトが進行中であり、ゲノムの大半を網羅する配列情報が得られている。これらのゲノム情報から、ゼニゴケの遺伝的重複性の低さが明らかになりつつある。例えば、フィトクロム、クリプトクロム、フォトトロピンのオルソログがそれぞれ 1 遺伝子しか存在しないことから、光受容体を介したシグナル伝達機構に関して、ゼニゴケは被子植物の原形を維持しつつ比較的冗長性の低い分子機構を持つことが示唆されている (京都大学生命科学研究科修士論文 片岡 2007、小松 2010、久保田 2010)。

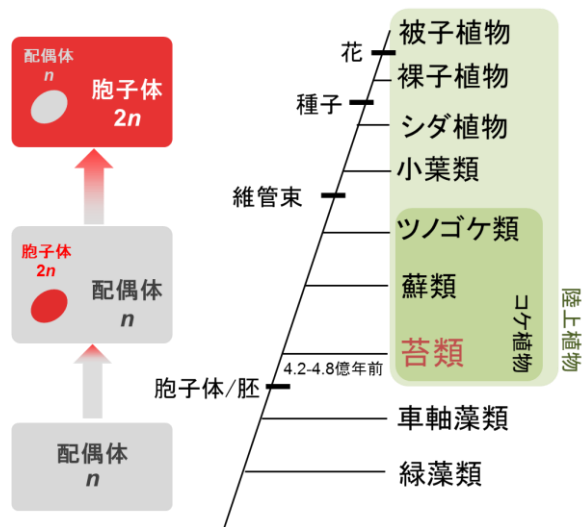


図 IV 緑色植物の進化系統樹 (Bowman et al., 2007 を元に改変)

各系統を特徴づける形質を左に示した。苔類は約 4 億年前に車軸藻類との共通祖先から分岐し、陸上植物の最も基部に位置すると考えられている。



図 V 苔類ゼニゴケの生活環

生活環のうち大半を配偶体世代 (n) が占める。山岡尚平博士作製を元に一部改変。

ゼニゴケにおける光周性生長相制御

ゼニゴケは長日条件下で生殖器形成を行う長日植物であることが古くから報告されている (Wann, 1925; Voth and Hamner, 1940)。また、ゼニゴケを含む複数種の苔類において、日長依存的な生殖器形成が報告されている (Benson-Evans, 1961, 1964)。近年、ゼニゴケは白色光に遠赤色光 (FR) を補光した長日条件下で生殖器形成が誘導されることが見出された (Chiyoda et al., 2008)。この応答には、赤色光・遠赤色光受容体フィトクロムである *Mpphy* が関与することが示唆されている。*Mpphy* は赤色光を受容することで活性型である Pfr 型へ、FR を受容することで不活性型である Pr 型へと可逆的に相互変換する。*Mpphy*^{Y241H} 変異型タンパク質は、この光可逆性を失い恒常的に活性型として機能する (片岡 2007)。*MpPHY*^{Y241H} を恒常的に高発現する形質転換植物は、FR 補光下においても生殖生長相への移行は見られないが、RNAi により *MpPHY* の遺伝子発現を抑制した植物では FR 補光をしていない白色光下においても生殖器形成が見られる。従って、活性型の *Mpphy* が赤色光下で生殖生長への移行を抑制していることが示唆された (京都大学生命科学研究科修士論文 保坂 2010)。これらの結果より、ゼニゴケの生長相転換は日長と光質により制御されており、被子植物の生長相転換、つまり花成と類似した分子メカニズムにより制御されることが考えられる。また、ゼニゴケの生長相転換は配偶体世代で起こるため、そのシグナル伝達機構の解明により、比較的知見の乏しい配偶体世代における生長相制御機構の理解が進むことが期待される。

現在 GI-FKF1 複合体を介した光周性による生長制御機構の研究はその大半が被子植物を用いたものであり、被子植物で広く保存されているこの機構が進化上いつ獲得されたのか、半数体世代中心の植物においても保存されているかは明らかとなっていない。そこで本研究では、苔類ゼニゴケにおける光周性生長相制御の分子機構を解析することで、陸上植物の進化の初期における光周性生長相制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。

結果

1. ゼニゴケの限界日長の解析

ゼニゴケは長日条件で生殖器官形成が促進される長日植物であることが報告されている (図 1A, Wann, 1925; Voth and Hamner, 1940; Benson-Evans, 1961, 1964)。しかし、生殖器官の形成に最低限必要な昼の長さ (限界日長) は明らかにされていない。そこで、野生株の無性芽をショ糖含有培地において連続白色光条件下で 10 日間培養後、FR を補光した異なる日長の明暗周期下に移動して、各個体のうち最初の発生初期の生殖器官が確認できるまでの日数を測定した。その結果、日長時間の増加に伴い生殖器官形成までの日数が減少することが明らかになった (図 1B)。8, 9, 10 時間明期を与えた個体間での生殖器官形成日数の差をみると、9 時間と 10 時間での日数差は約 10 日であり、16 時間の場合と比較しても 20 日程度の差であったのに対し、8 時間と 9 時間の間ではわずか 1 時間の差で生殖器官形成までの日数が約 40 日増加し、8 時間では生殖器官形成が見られない個体が観察された (図 1B)。このことから、ゼニゴケの限界日長が 8 時間付近に存在し、それ以上の日長条件が生殖器官形成を促進することが示唆された。

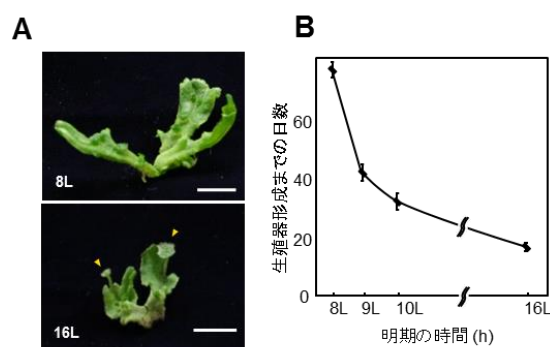


図 1. ゼニゴケの限界日長の決定

(A) 短日 (8 時間明期) および長日 (16 時間明期) 条件で生育した、生育 35 日目の植物体。黄色矢尻は生殖器官を示す。スケールバーは 10 mm。 (B) ゼニゴケ野生株の生殖器官形成までの日数。横軸は明期の時間、縦軸は生殖器官誘導条件移行後から発生初期の生殖器官が観察されるまでの日数。エラーバーは \pm SD。n=10。

2. MpGI、MpFKF の単離と一次構造解析

前項の結果によりゼニゴケの生長相転換（生殖器官形成）が日長で制御されることが示唆された。被子植物においては、日長による花成の制御には **GI-FKF1** 複合体が関わることが知られている (Sawa et al., 2007)。そこで、ゼニゴケの生長相転換に同様の分子メカニズムが関わるかどうかを明らかにするために、ゼニゴケゲノムデータベースを用いて、*GI* および *FKF1* 遺伝子のホモログ検索を行った。その結果、ゼニゴケゲノム上に被子植物の *GI* および *FKF1/LKP2/ZTL* ファミリーと高い相同性を示す遺伝子が 1 分子種ずつコードされることが明らかになったため、*GI* のホモログを *MpGI*、また、*FKF1/LKP2/ZTL* のホモログを、その一次構造に基づき *MpFKF* と命名した。*MpGI*、*MpFKF* のイントロン挿入位置は、*MpGI* の第 1 イントロンを除いてすべてシロイヌナズナと一致していた (図 2A, 3A)。*MpGI* は 1,187 アミノ酸からなる分子量約 127.5 kDa のタンパク質をコードする遺伝子であった (図 2)。また、*MpGI* と *AtGI* のアミノ酸配列を比較すると、N 末端側の 680 アミノ酸および C 末端側の 300 アミノ酸の相同性が高く、同一アミノ酸残基がそれぞれ 53% および 42%、類似アミノ酸残基がそれぞれ 68% および 57% の割合で存在していた。このことから *MpGI* が被子植物の *GI* のオルソログである可能性が示唆された (図 2B)。

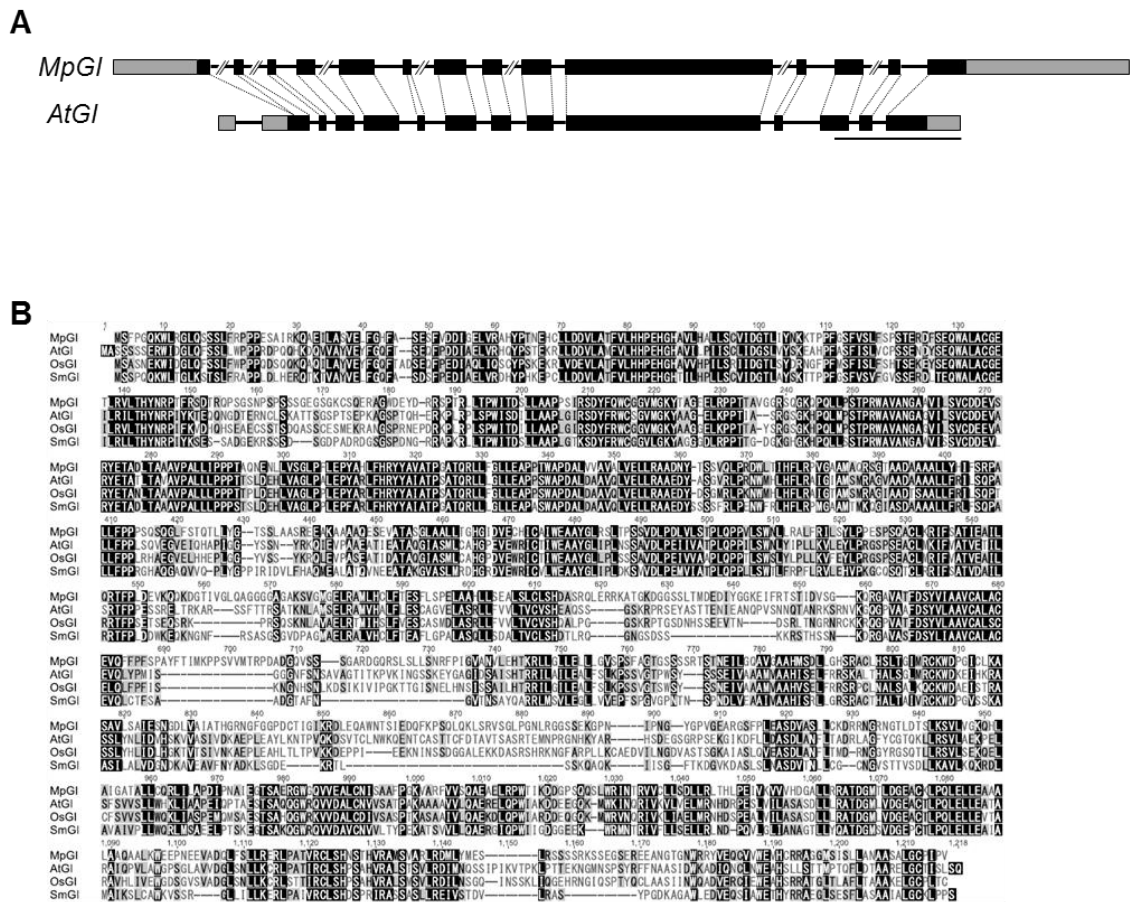


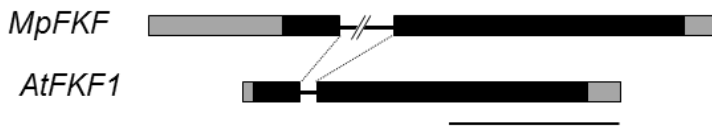
図 2. *MpGI* 遺伝子のエキソン-イントロン構造と一次構造解析

(A) *MpGI* 遺伝子および *AtGI* 遺伝子のエキソン-イントロン構造。黒四角がエキソンを、灰色四角が UTR を、四角間をつなぐ黒棒がイントロンを示す。対応するイントロン挿入位置を点線で示した。バーは 1 kb。(B) ゼニゴケおよび他植物由来の GI タンパク質のマルチプルアライメント。保存された残基を黒、性質のよく似た残基をグレーの網掛けで示す。AtGI: シロイヌナズナ; OsGI: イネ; SmGI: イヌカタヒバの GI ホモログ。

MpFKF は 635 アミノ酸からなる分子量約 69.5 kDa のタンパク質をコードする遺伝子であった (図 3)。*MpFKF* とシロイヌナズナの *FKF1* およびそのパラログである *ZTL*、*LKP2* (Somers et al., 2000; Schultz et al., 2001) のアミノ酸全長とのアラインメントを作成した結果、*MpFKF* はシロイヌナズナの *FKF1*/*LKP2*/*ZTL* 配列と同様に LOV ドメイン、F-box および 6 つの *kelch* リピートから構成されていた (図 3B)。*MpGI* と *AtFKF1* の配列を比較すると、これらの 3 つのドメイン内においては、同一アミノ酸残基が 66%、類似アミノ酸残基が 84% 存在しており、各ドメイン内の保存性が非常に高いことが明らかとなった (図 3B)。特に、LOV ドメインの発色団結合部位であるシステイン残基が保存されていたこと

から (Imaizumi et al., 2003)、MpFKF は FMN を発色団とする青色光受容体として機能する可能性が推測された (図 3B)。MpFKF と既知の維管束植物の FKF1 ホモログのアミノ酸配列全長を用いて最尤法により系統樹を作成したところ、MpFKF は被子植物の FKF1 クレードと LKP2/ZTL クレードとは独立して、イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) の FKF1 ホモログと同一のクレードを形成した (図 4)。このことから MpFKF はイヌカタヒバの FKF1 ホモログと最も近縁であることが示唆された。

A



B

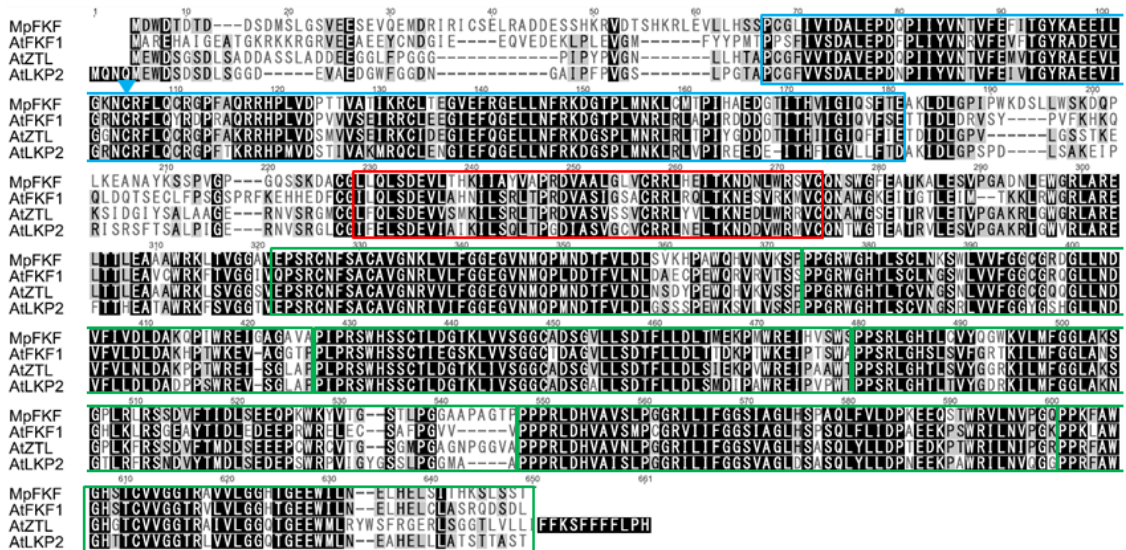


図 3. MpFKF 遺伝子のエキソン-イントロン構造と一次構造解析

(A) MpFKF 遺伝子および AtFKF1 遺伝子のエキソン-イントロン構造。黒四角がエキソンを、灰色四角が UTR を、四角間をつなぐ黒棒がイントロンを示す。対応するイントロン挿入位置を点線で示した。バーは 1 kb。(B) MpFKF および AtFKF1, AtZTL, AtLKP2 タンパク質のマルチプルアライメント。保存された残基を黒、性質のよく似た残基をグレーの網掛けで示す。LOV ドメインを青、F-box を赤、kelch リピートを緑の枠で囲った。青三角は発色団結合部位のシステイン残基。

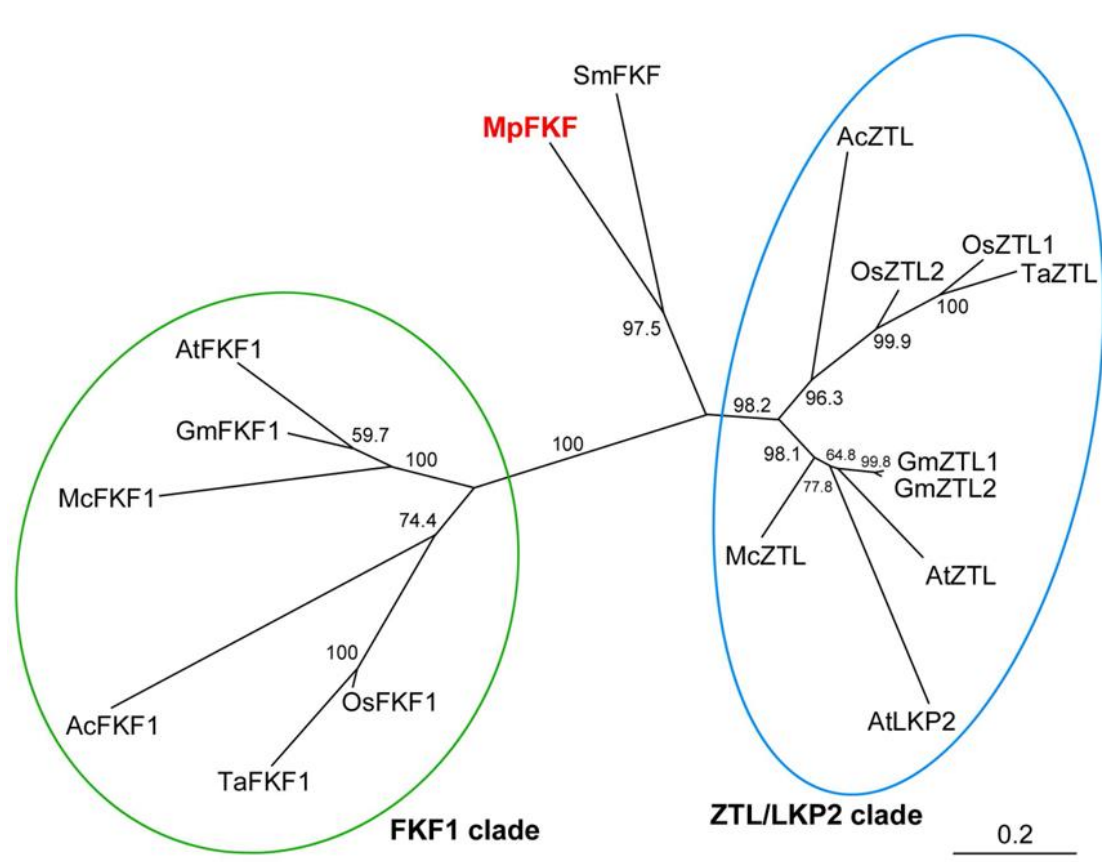


図 4. MpFKF の分子系統解析

最尤法による MpFKF 全長アミノ酸配列の系統樹。AtFKF1, AtZTL, AtLKP2: シロイヌナズナ; OsFKF1, OsZTL1, OsZTL2: イネ; GmFKF1, GmZTL1, GmZTL2: ダイズ; TaFKF1, TaZTL: コムギ; AcFKF1, AcZTL: タマネギ; McFKF1, McZTL: アイスプラント; SmFKF: イヌカタヒバの FKF1/ZTL/LKP2 ホモログ。FKF1 ホモログ又は ZTL/LKP2 ホモログから構成されるクレードをそれぞれ黄緑と水色で囲った。バーは進化距離、系統樹中の数字はブートストラップ確率 (1,000 回試行)。

3. *MpGI*, *MpFKF*の発現量の日内変動

シロイヌナズナにおいては、*GI*と*FKF1*のmRNAの蓄積量は日周変動を示し、その発現が概日時計によって制御されることが報告されている (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999; Nelson et al., 2000)。そこで、定量的PCR (qPCR) 法により、12時間明期12時間暗期の明暗条件 (12L12D)、または12L12Dから恒常明条件 (LL)、あるいは恒常暗条件 (DD)へ移行後の葉状体における*MpGI*、*MpFKF*の発現量の日内変動を解析した (図5)。その結果、*MpGI*および*MpFKF*の発現量は12L12D下とともに明期開始後12時間目 (ZT12) にピークをもつ明暗応答を示した (図5A, D)。さらにこの発現様式はLLおよびDD移行後も持続していた (図5B, C, E, F)。*MpGI*の発現リズムは、DD下では比較的高振幅でリズムが持続したのに対して、LL下ではLL移行後16時間目以降の発現量が全体的に増加し、振幅が減少した (図5B, C)。*MpFKF*の発現リズムの振幅は*MpGI*と比較すると小さく、恒常条件移行後も*MpGI*ほど明瞭には持続しなかった (図5E, F)。これらの結果より、*MpGI*と*MpFKF*は同一の時間帯に高発現しており、ともに概日時計および光による制御を受けることが示唆された。

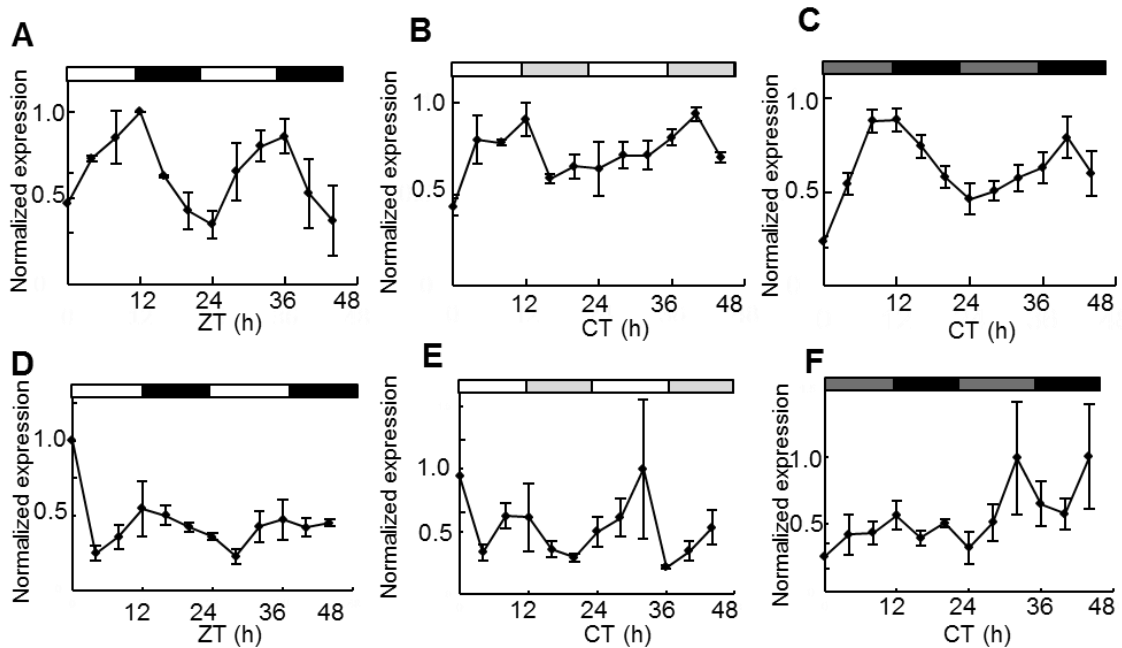


図5. *MpGI*および*MpFKF*のLD, LL, DD下の発現リズム解析

MpGI (A-C) および *MpFKF* (D-F) のmRNAの蓄積量変化。12L12D下 (A, D), LL (B, E) またはDD (C, F) 移行後48時間の解析結果。グラフ上のバーは白が昼、黒が夜、薄い灰色がLL移行前の夜に相当する時間 (主観的夜)、濃い灰色がDD移行前の昼に相当する時間 (主観的昼)。ZTは実時間 (ツァイトゲバー時間)、CTは恒常条件移行後の時間。エラーバーは±SEM。n=3。

4. *MpGI*および*MpFKF*の発現組織解析

*MpGI*および*MpFKF*の発現する組織を解析するために、*GI*および*FKF*遺伝子のプロモーターに GUS レポーターを連結した形質転換植物 (*MpGIpro:GUS* および *MpFKFpro:GUS*) を作出し、発現組織解析を行った。これらの植物について、LL 下で 10 日間培養した葉状体の GUS 染色を行った結果、*MpGIpro:GUS*は特にメリステム付近から中肋を中心として、*MpFKFpro:GUS*は植物体全体において GUS 染色が見られた (図 6)。このことから、*MpGI*と*MpFKF*はともに葉状体において広く発現しており、特にメリステムから中肋にかけての領域で発現が重複することが示唆された。

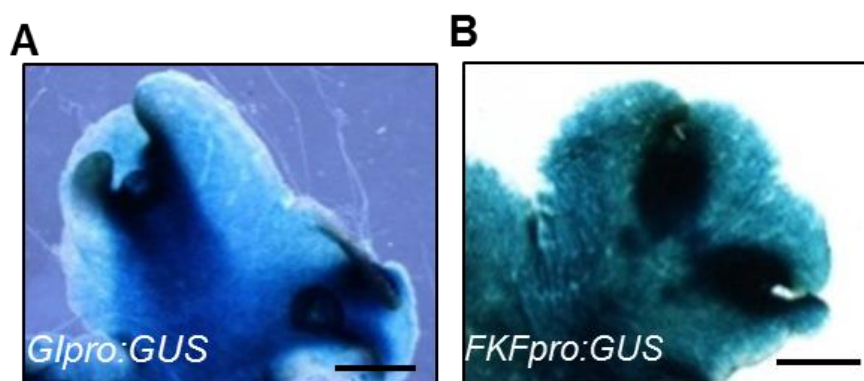


図 6. *MpGI*と*MpFKF*の発現組織解析

(A, B) LL 下で 10 日間生育した *GIpro:GUS* (A), *FKFpro:GUS* (B) 発現株の葉状体の GUS 染色結果。スケールバーは 1 mm。

5. MpGI および MpFKF の相互作用の検証

シロイヌナズナでは、GI と FKF1 は長日条件特異的に相互作用し *CO* の転写抑制因子 CDF1, CDF2, CDF3, CDF5 を分解することで花成を促進する (Sawa et al., 2007; Fornara et al., 2009)。そこで、MpGI と MpFKF の相互作用能を解析した。

5.1 酵母ツーハイブリッド法による MpGI および MpFKF の相互作用解析

酵母ツーハイブリッド法により MpGI と MpFKF の相互作用を検証した。MpGI および MpFKF の全長および部分長を Gal4 の転写活性化ドメイン (AD) または DNA 結合ドメイン (DBD) に連結させたベクターを作成し、すべての組み合わせについて分子間相互作用を評価した。その結果、MpGI 全長 (GI-FL) と MpFKF 全長 (FKF-FL) の組み合わせと、GI-FL と MpFKF の LOV ドメイン及び F-box を含む N 末端側 (FKF-LOV+F) の組み合わせ、MpGI の N 末端側 392 アミノ酸 (GI-N) と FKF-LOV+F の 3 種の組み合わせをもつ酵母が、選抜培地上でコロニーを形成した (図 7)。このことから、MpGI と MpFKF が酵母内で相互作用することが示唆された。また、MpGI の N 末端側と MpFKF の LOV ドメインが相互作用に関与することが示唆された。

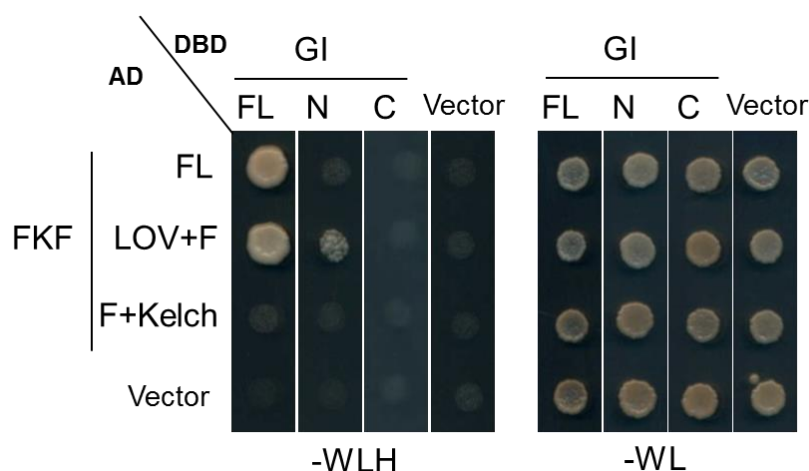


図 7. 酵母ツーハイブリッド法による MpGI と MpFKF の相互作用解析

GI 全長 (GI-FL: 1-1,187a.a.); GI の N 末端側 (GI-N: 1-392a.a.); GI の C 末端側 (GI-C: 383-1,187a.a.); FKF 全長 (FKF-FL: 1-635a.a.); FKF の LOV ドメインおよび F-box ドメイン (FKF-LOV+F: 1-291a.a.); FKF の F-box ドメインおよび kelch リピート (F+Kelch: 181-635a.a.) を Gal4 の転写活性化ドメイン (AD) または DNA 結合ドメイン (DBD) に連結させ、相互作用を検証した。ヒスチジンアッセイの結果として 28°C で 3 日間培養した後の酵母のコロニーを示す。-WLH は選抜培地、-WL は非選抜培地。

5.2 共免疫沈降法による MpGI と MpFKF の相互作用解析

5.1 で示された MpGI と MpFKF の相互作用が *in vivo* においても起こるか検証するために、共免疫沈降による相互作用解析を行った。タグを付与した *MpGI-3xFLAG* (*MpGI-FLAG*) および *MpFKF-4xmyc* (*MpFKF-myc*) を *ELONGATION FACTOR1-α* (*EF*) プロモーターにより過剰発現させるコンストラクトを Tak-1 株に導入し、*MpGI-FLAG MpFKF-myc* 共過剰発現植物 (*GI^{ox}FKF^{ox}*) を作出した。ネガティブコントロールとして *EF* プロモーター下で *MpGI-FLAG* のみを過剰発現する植物 (*GI^{ox}*) を作出した。これらの植物を 10 日間連続白色光下で培養後、FR を補光した 16L8D 条件に移動して、8 日目の ZT 12 の植物体を回収して調製した細胞破碎液を用いて、myc 抗体による免疫沈降を行った。その結果、*GI^{ox}FKF^{ox}* においてのみ FKF-myc と GI-FLAG が共免疫沈降された (図 8)。このことから、*in vivo* において MpGI-FLAG と MpFKF-myc が相互作用することが示唆された。

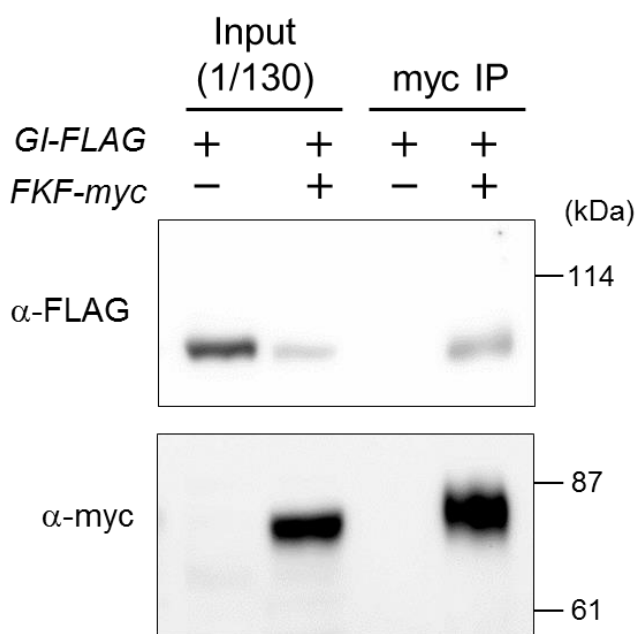


図 8. 共免疫沈降による MpGI-FLAG および MpFKF-myc の相互作用解析

EFpro:GI-FLAG 発現株 (*GI^{ox}*)、*EFpro:GI-FLAG EFpro:FKF-myc* (*GI^{ox}FKF^{ox}*) 発現株を用いた共免疫沈降解析。myc 抗体 (α -myc) つきのマイクロビーズを用いて免疫沈降を行い、 α -FLAG によるウェスタンブロットを行った。Input には全タンパク質画分の 130 分の 1 量、myc IP にはビーズに吸着した画分の 3 分の 1 を泳動した。

6. *MpGI*および *MpFKF* ノックアウト株の表現型解析

前項の結果により *MpGI* と *MpFKF* が複合体を形成することが示唆された。そこで、*MpGI*-*MpFKF* 複合体のゼニゴケにおける機能を明らかにするために、ノックアウト株の作出と生長相転換時の表現型解析を行った。

6.1 ノックアウト株の作出

*MpGI*および *MpFKF* ノックアウト株 *gi^{ko}*, *fkf^{ko}* を作出するために、*MpGI*は第2エキソンが、*MpFKF*は発色団結合に関わるとされるシステイン残基を含む第2エキソンの上流領域が、それぞれハイグロマイシン耐性遺伝子 (*MpEFpro:hpt*) に置換されたコンストラクトを作成し (図 9A, B)、Tak-1 と Tak-2 の交配により得られた F1 胞子に形質転換した。得られた薬剤耐性株について、PCR によるノックアウト株の選抜を行った。まず、相同組み換えにより *MpEFpro:hpt* に置換された領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、野生株由来の増幅断片は検出されず、*MpEFpro:hpt* 由来の増幅断片のみが得られる株が、*MpGI*および *MpFKF*についてそれぞれ1株ずつ単離された (図 9C, D)。次に、目的の置換領域の外側のゲノム上に位置するプライマーと *MpEFpro:hpt* 上に位置するプライマーを用いて PCR を行った。その結果、野生株では増幅がみられなかったのに対し、ノックアウト候補株では目的のサイズに特異的な増幅がみられた (図 9C, D)。得られた株から RNA を抽出し、半定量 RT-PCR により *MpGI*、*MpFKF*の発現量を解析したところ、各遺伝子の発現量は、それぞれ *gi^{ko}*, *fkf^{ko}*株において野生株に比べて減少していた (図 9E, F, G)。これらのことから、単離した *gi^{ko}*, *fkf^{ko}*株において、目的の領域で相同組み換えによる *MpEFpro:hpt* の挿入が生じており、*MpGI*、*MpFKF* 遺伝子の発現がそれぞれ顕著に低下していることが示唆された。

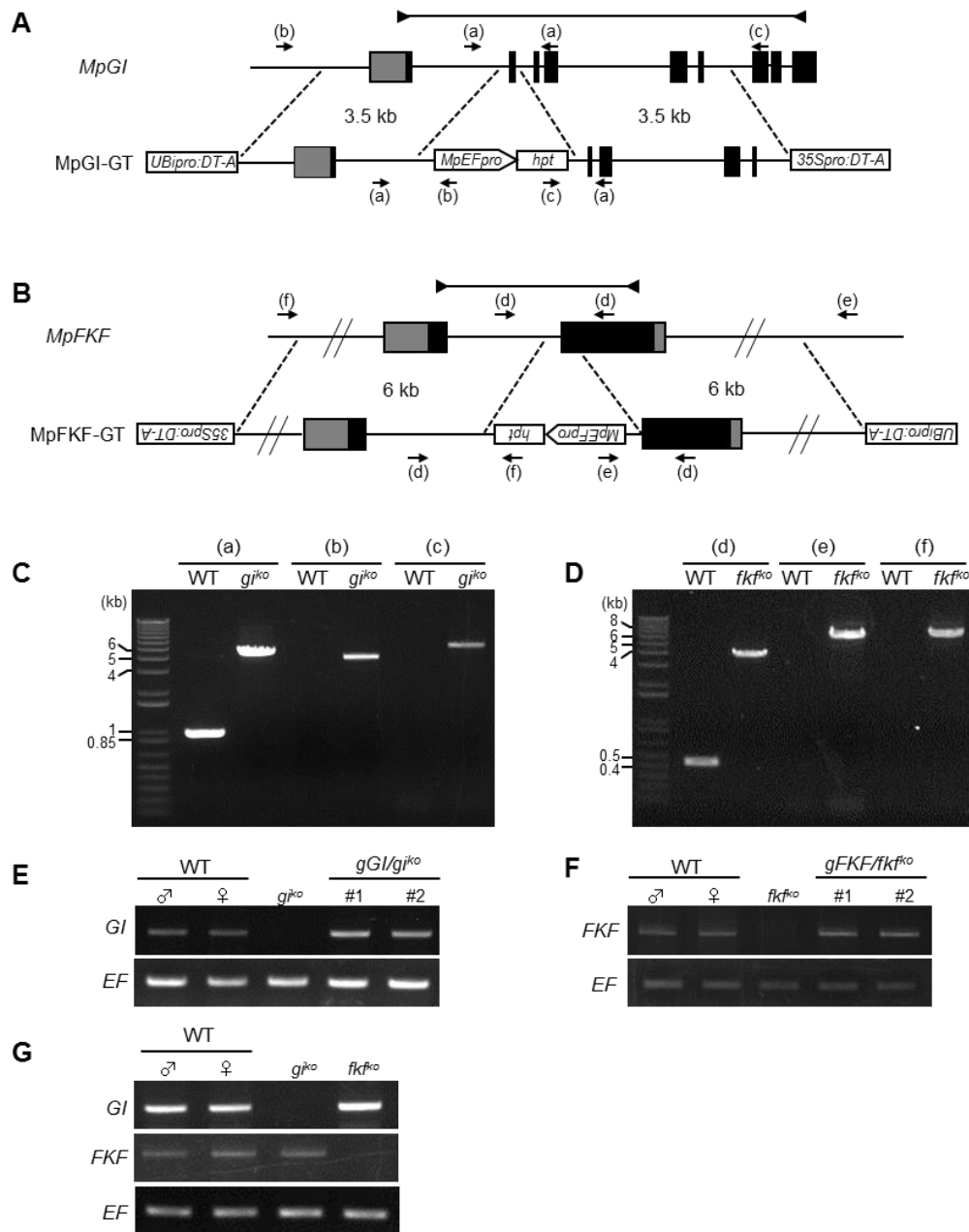


図 9. *MpGI* および *MpFKF* のノックアウト株の作出と、ノックアウト株における各遺伝子の発現解析

(A, B) *MpGI* (A) および *MpFKF* (B) のジーンターゲティング用コンストラクトの模式図。アルファベット付き矢印は、(C)、(D) で示した PCR に用いたプライマーセットの位置。プライマー a, d は、*MpEFpro:hpt* の挿入がおこる座位を、プライマー b, f は 5'側ののりしろ部分を、プライマー c, e は 3'側ののりしろ部分を増幅するプライマーセット。黒三角つきのバーは (E) から (G) における半定量 RT-PCR で増幅した領域。(C, D) 野生型株 (WT)、*gi^{ko}* (C)、*fkf^{ko}* (D) のゲノム DNA を鋳型として、(A), (B) で示したプライマーセットを用いて行った PCR 産物の電気泳動結果。(E-G) 半定量 RT-PCR 法による WT、*gi^{ko}*、*fkf^{ko}*、それぞれのノックアウト株に遺伝子全長を導入した株 (*gGI/gi^{ko}*、*gFKF/fkf^{ko}*) における *MpGI* および *MpFKF* の蓄積量解析。内部標準のコントロールとして *EF* を用いた。*MpGI* および *MpFKF* の増幅には 24 サイクル、*EF* の増幅には 20 サイクルの PCR 反応を行った。

6.2 gi^{ko} および fkf^{ko} の生長相転換時の表現型解析

前項で作出した gi^{ko} 、 fkf^{ko} および雌雄の野生株 Tak-1, Tak-2 を第 1 項と同様に FR を補光した長日条件で培養し、FR 補光した 16 時間明期 8 時間暗期の長日条件に移してから生長相転換が生じるまでの日数を計測した (図 10)。その結果、Tak-1, Tak-2 は 2 週間程度で生殖器形成が見られたが、 gi^{ko} および fkf^{ko} は 60 日を過ぎても生殖器の形成が見られなかった (図 10B)。 gi^{ko} および fkf^{ko} に *MpGI* または *MpFKF* 遺伝子全長を導入した株 (gGI/gi^{ko} , $gFKF/fkf^{ko}$) では、野生型株と同様に、約 2 週間で生殖器の形成が見られた (図 9E, F, 10B)。従って *MpGI* 又は *MpFKF* は長日条件下での生殖器官形成に必要であることが示唆された。第 5 項で得られた *MpGI* と *MpFKF* が相互作用する結果とあわせると (図 7, 8)、*MpGI*-*MpFKF* 複合体の形成がゼニゴケの生殖器形成に必須である可能性が考えられた。

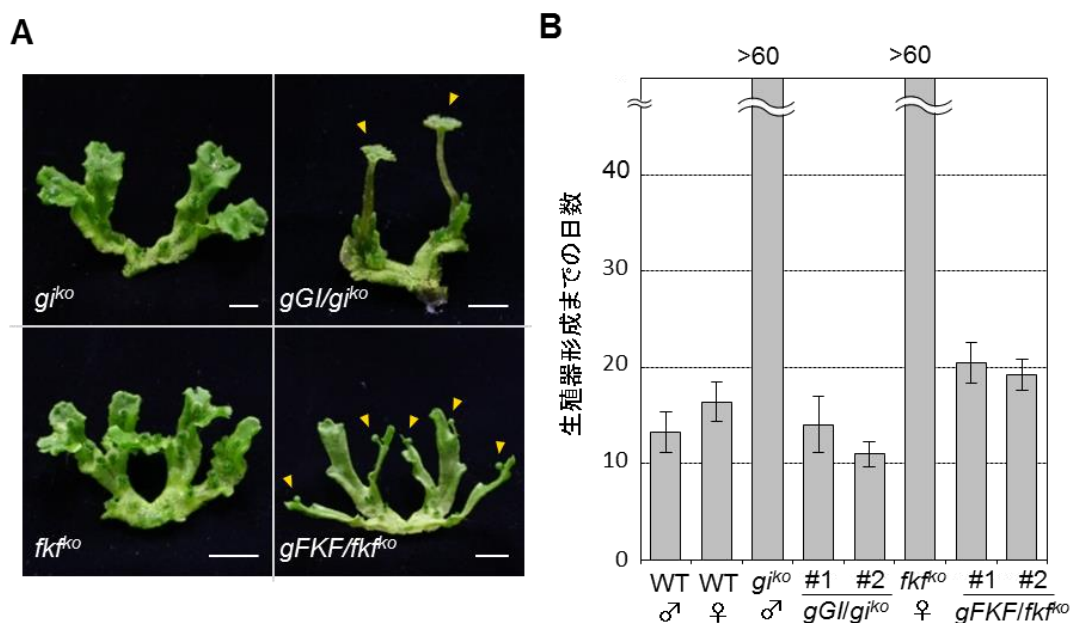


図 10. gi^{ko} , fkf^{ko} の生長相転換時期の解析

(A) 無性芽播種後 35 日目の gi^{ko} , fkf^{ko} , gGI/gi^{ko} , $gFKF/fkf^{ko}$ の植物体。矢尻は生殖器を示す。スケールバーは 10 mm。(B) 野生株 (WT) および各ノックアウト系統の葉状体を FR 補光した長日条件に移行した後、各個体において発生初期の生殖器が最初に観察されるまでの日数。エラーバーは \pm SD; $n \geq 15$ 。

7. *MpGI*, *MpFKF* 過剰発現体の表現型解析

シロイヌナズナにおいては、*GI* と *FKF1* の共過剰発現により *GI-FKF1* 複合体の蓄積量が増加し、短日条件下において長日条件とほぼ同様の花成の表現型を示すことが報告された (Sawa et., 2007)。そこで、*MpGI-MpFKF* 複合体のゼニゴケにおける光周性生長相転換に対する寄与について検証するために、5.2 で作出した *GI^{lox}*, *GI^{lox}FKF^{bx}* に加え、*MpEFpro:MpFKF-myc (FKF^{bx})* の生殖器形成にかかる日数を計測した (図 11A, B)。その結果野生株では、長日条件においては 2 週間程度で生殖器形成がみられたのに対し、8 時間明期 16 時間暗期の短日条件では生殖器形成が大幅に遅延した (図 11B)。しかし、*GI^{lox}*, *FKF^{bx}* では短日条件においても野生株の長日条件下とほぼ同じ日数で生殖器形成が観察された (図 11B)。さらに、これらの過剰発現株では、長日条件においても野生株よりやや早い時期に生殖器形成が観察された (図 11B)。このことから、*MpGI* および *MpFKF* はゼニゴケの生長相転換を促進することが示唆された。また、*GI^{lox}FKF^{bx}* の共過剰発現株においては、単独の過剰発現株と比較して生殖器形成時期にほとんど差がみられなかった (図 11B)。さらに、*flk^{ko}* 背景において *MpGI-FLAG* を、*gi^{ko}* 背景において *MpFKF-myc* を過剰発現させた株は、それぞれ短日条件下で 60 日以上生育させても生殖器の形成がみられなかった (図 11C)。これらのことから、*MpGI* と *MpFKF* が遺伝的に同一の経路で機能しており、*MpGI* および *MpFKF* は単独ではなく、相互依存的に働いて生長相転換を促進することが示唆された。第 5 項の結果より両者は複合体を形成することから (図 7, 8)、*MpGI-MpFKF* 複合体がゼニゴケの生長相転換促進に必要であると考えられる。

一方 *FR* を補光しない長日条件において同様の観察を行った結果、いずれの過剰発現系統においても、10 個体以上の葉状体が、60 日を経過しても生殖器を形成しなかった。さらにこれらの過剰発現系統は、通常の継代培養条件下では少なくとも 1 年間は生殖器形成がみられなかった。このことから、*FR* 補光は *MpGI-MpFKF* による生長相転換に必須であり、*FR* を介したシグナルは *MpGI-MpFKF* より下流に作用することが示唆された。

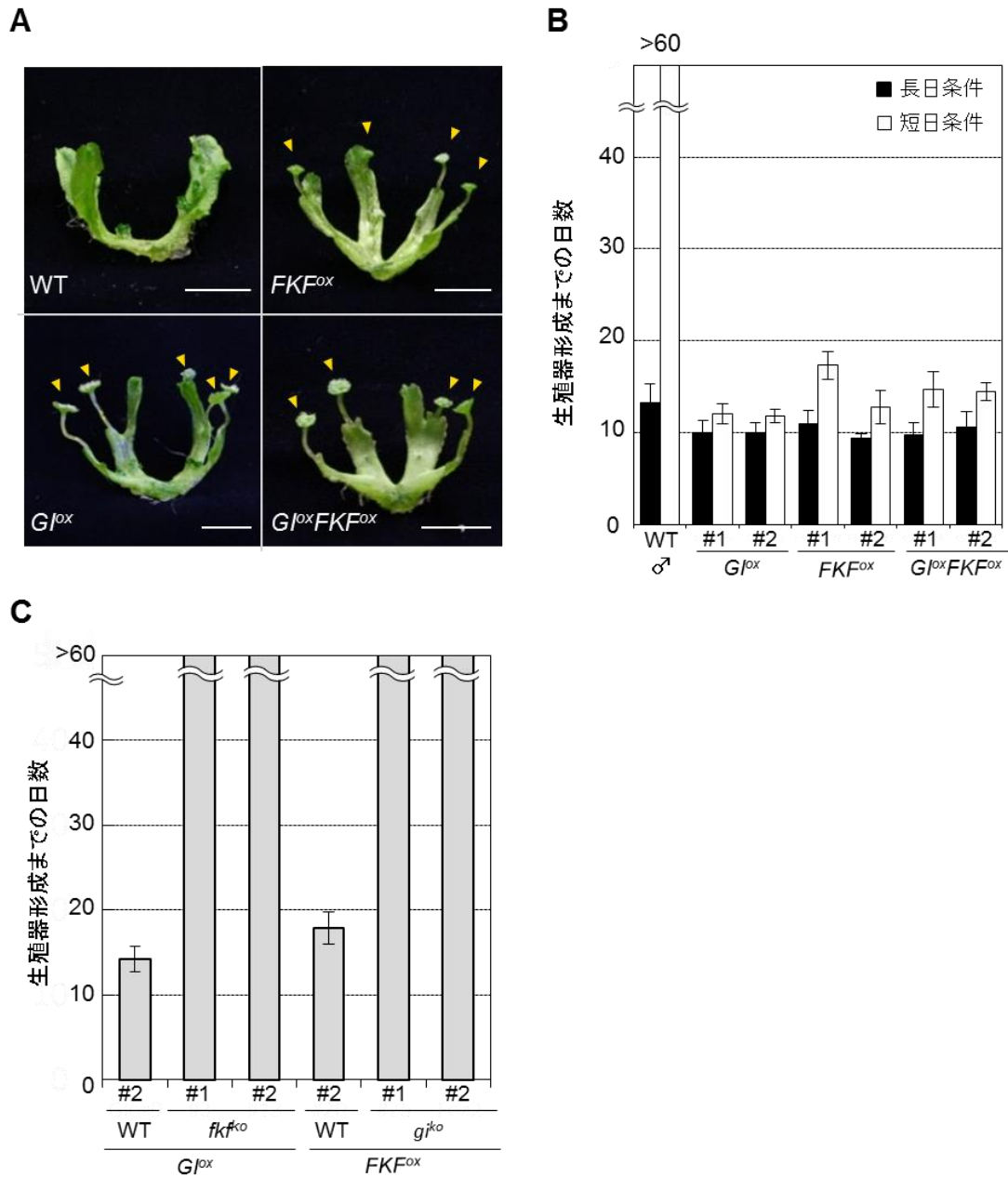


図 11. *MpGI* および *MpFKF* 過剰発現系統における生長相転換時期の解析

(A) 無性芽播種後 35 日目の WT および過剰発現系統の植物体。矢尻は生殖器を示す。スケールバーは 10 mm。(B) 各ラインの葉状体を FR 補光した長日および短日条件に移行した後、各個体において発生初期の生殖器が最初に観察されるまでの日数。エラーバーは \pm SD; $n \geq 15$ 。(C) gI^{ko} 背景で *MpGI* を、あるいは fkf^{ko} 背景で *MpFKF* を過剰発現させた植物体において、FR 補光した短日条件下で発生初期の生殖器が最初に観察されるまでの日数。エラーバーは \pm SD; $n \geq 8$ 。

8. *MpGI*によるシロイヌナズナ *gi*変異体の相補実験

前項までの結果で、*MpGI*-*MpFKF* 複合体がゼニゴケの配偶体世代の生長相転換を制御することが示唆された。そこで、*MpGI* の機能が進化的に保存されているか調べるために、シロイヌナズナの *gi* 欠損変異体に *AtGIpro:MpGI* を導入し、遅咲きの表現型が相補されるか解析した。*AtGI* のプロモーターに、*MpGI* の CDS 配列を結合したコンストラクト *AtGIpro:MpGI* を作出し、シロイヌナズナ *gi-2* 変異体に形質転換し、独立した複数の T1 植物に由来する T3 ホモの種子を得た (*AtGIpro:MpGI/gi-2* #1, 2)。野生型株 Col、*gi-2* 欠損変異体、および *AtGIpro:MpGI/gi-2* #1, 2 を長日条件下で栽培し、抽臺時のロゼット葉の枚数を指標に花成時期の測定を行った (図 12)。その結果、Fower et al., 1999 で報告されていた通り *gi-2* 欠損変異体は Col と比較して遅咲きの表現型を示した。一方 *AtGIpro:MpGI/gi-2* #1, 2 は Col よりも遅咲きだが、*gi-2* 欠損変異体よりは早咲きの表現型を示し、*gi-2* 欠損変異体の遅咲きの表現型を部分的に相補した (図 12A)。このことより、*MpGI* タンパク質がもつ生長相制御機能は陸上植物の進化上保存されていることが示唆された。

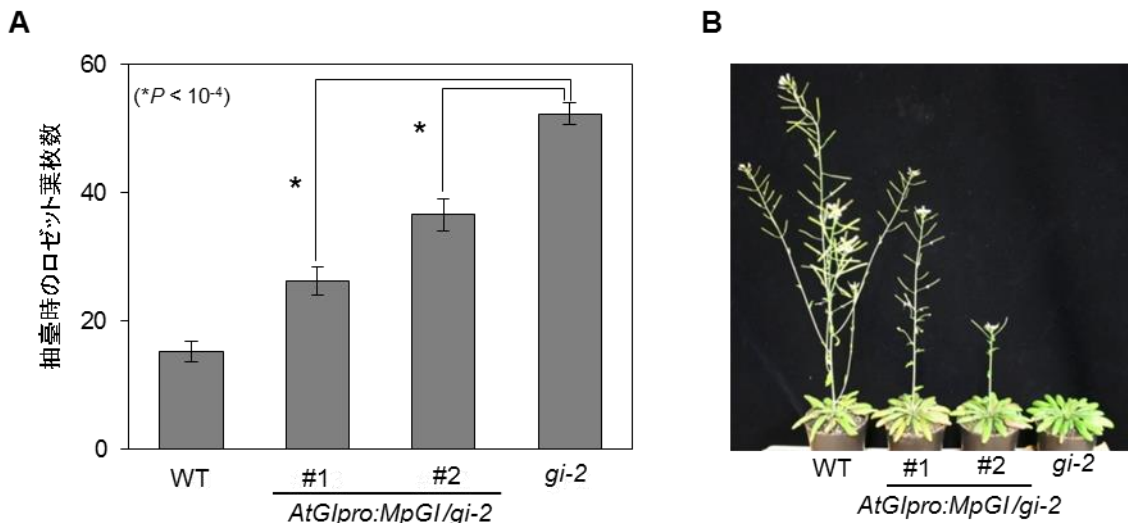


図 12. *MpGI*によるシロイヌナズナ *gi*変異体の相補実験

野生型 (WT), *gi-2*, *AtGIpro:MpGI/gi-2* を長日条件下で生育した。(A) 抽臺時のロゼット葉の枚数。エラーバーは \pm SD; $n \geq 10$ 。アスタリスクは Student's *t*-test により算出した P 値が 10^{-4} 以下であることを示す。(B) 播種後 45 日目の植物体。

考察

1. ゼニゴケには *GI* 遺伝子および *FKF1* 遺伝子のカウンターパートが存在する

本研究において、被子植物の *GI* および *FKF1/ZTL/LKP2* のホモログがゼニゴケのゲノム上に 1 分子種ずつコードされていることを明らかにした (図 2, 3, 4)。これらの遺伝子の遺伝子構造やアミノ酸配列、ドメイン構造はシロイヌナズナと高い相同性を示したことから、*GI* と *FKF1/LKP2/ZTL* が陸上植物の進化過程において保存された遺伝子であることが示唆された。系統解析では、*MpFKF* は被子植物の *FKF1* クレードと *ZTL/LKP2* クレードと独立したクレードを形成した (図 4)。*MpFKF* の mRNA の日内変動解析では、*MpFKF* は低振幅ではあるものの概日時計による制御を受けることが明らかとなり、シロイヌナズナの *FKF1* と類似した挙動を示すことが明らかとなった (図 5D-F)。シロイヌナズナの *FKF1*、*LKP2*、*ZTL* の mRNA の発現量を比較すると、発現量比は *ZTL* が圧倒的に高く、次いで *FKF1* で、*LKP2* は両者と比較してほとんど発現していないことが報告されている (Baudry et al., 2010)。さらに、*FKF1* は mRNA およびタンパク質蓄積量の変化が概日リズムを刻むのに対して (Nelson et al., 2000; Imaizumi et al., 2003)、*ZTL* は mRNA レベルでは概日リズムを刻まず、タンパク質蓄積量が日内変動することが明らかにされている (Somers et al., 2000)。このことから、*FKF1/ZTL/LKP2* ファミリー遺伝子は、遺伝子重複および機能分化の過程において、プロモーター上のシス配列の変化などを介して自身の制御機構を独自に進化させたことが考えられた。

GUS レポーターを用いた解析により、*MpGI* と *MpFKF* は、中肋からメリステムまでの領域にかけて連続的に共発現することが示唆された (図 6)。*MpGI*-*MpFKF* 複合体はゼニゴケの生長相転換を制御すると考えられるため (図 7, 8, 10, 11)、生殖器形成が観察されるメリステムから空間的に離れた中肋や葉状体基部で発現している *MpGI* および *MpFKF* は、1. 生長相転換とは別の生理応答に関与する、2. これらの組織における *MpGI* および *MpFKF* の発現が、メリステムにおける生長相制御に関与する、の 2 つの可能性が考えられた。

シロイヌナズナにおいて、*GI* および *FKF1/ZTL/LKP2* は茎頂を含む様々な組織、器官で発現することが報告されており (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999; Nelson et al., 2000; Somers et al., 2000; Schultz et al., 2001)、花成制御以外にも、塩ストレスシグナル経路 (Kim et al., 2013) や概日時計の制御 (Mas et al., 2003; Gould et al., 2006; Kim et al., 2007)、胚軸長の制御 (Huq et al., 2000)、ABA を介した乾燥ストレス応答 (Riboni et al., 2013) などの様々な応答に関与することが明らかにされている。*MpGI* や *MpFKF* もゼニゴケの葉状体において同様に、生長相制御とは異なる生理応答に関与している可能性が考えられる。

一方、シロイヌナズナの *GI*-*FKF1* を介した花成制御機構においては、*GI*-*FKF1* は *CO* の転写抑制因子である *CDF1* を分解することで *CO* の転写を促進することが示唆されてい

る (Sawa et al., 2007)。GI-FKF1 を介した *CO* の転写制御は、*CDF1* および *CO* の発現部位である葉の維管束の篩部伴細胞で起こると考えられている (Imaizumi et al., 2005)。その後、*CO* によって転写された *FT* の翻訳産物が茎頂へと長距離輸送されることで花成が誘導される (Corbesier et al., 2007; Notaguchi et al., 2008)。ゼニゴケの生長相制御も、MpGI と MpFKF の下流因子の発現組織がメリステムに限定されており、この領域で細胞自律的に生長相転換を制御する可能性や、葉状体基部や中肋で形成された MpGI-MpFKF 複合体が、細胞非自律的にメリステムの生長相転換を制御する可能性が考えられる。ゼニゴケには被子植物における維管束のように物質輸送に特化した通導組織は存在しないため、FT タンパク質のような長距離輸送シグナルが存在する可能性は低い、FT とは異なる、比較的短距離の細胞間シグナル伝達系によって、MpGI および MpFKF が細胞非自律的に生長相転換を制御する可能性は考えられる。

2. MpGI は MpFKF と植物体内において相互作用する

酵母ツーハイブリッド法により、MpGI と MpFKF は、MpGI の N 末端側と MpFKF の LOV ドメインを介して相互作用することが示唆された (図 7)。また、MpGI と MpFKF は生体内においても相互作用することが示唆された (図 8)。シロイヌナズナでは、GI と FKF1 または GI と ZTL は青色光依存的に複合体を形成することが知られている (Kim et al., 2007; Sawa et al., 2007)。今後 MpGI と MpFKF の相互作用の光依存性について解析を行うことで、被子植物の祖先型の GI、FKF1 がどのような分子機構によって日長認識を行っているか、明らかにすることができると期待される。

また、今回解析した条件においては、*GI^{ox}* と *GI^{ox}FKF^{fbx}* を比較すると、*GI^{ox}FKF^{fbx}* における MpGI-FLAG のタンパク質蓄積量が *MpGI^{ox}* と比較して減少する傾向がみられた (図 8)。この結果により、ゼニゴケ体内で MpFKF-myc の過剰発現により MpGI-FLAG が分解されている可能性が考えられた。さらに、これらの過剰発現系統における生長相転換時の表現型を比較すると、複数の独立した系統で共通して、*GI^{ox}* と比較して *FKF^{fbx}* および *GI^{ox}FKF^{fbx}* で生殖器形成にかかる日数がやや増加する傾向がみられた (図 11)。この結果は、MpFKF-myc の過剰発現によって MpGI タンパク質が分解されることで、MpGI-MpFKF 複合体の存在量が減少して表現型が弱まったためと解釈することもできる。被子植物において、FKF1 による GI の分解制御に関してはいまだ報告例がなく、むしろ逆に GI と FKF1 のパラログである ZTL が相互作用して互いのタンパク質安定性を向上させることが示唆されている (Kim et al., 2007)。ゼニゴケにおいては、MpGI と MpFKF の間に独自の制御機構が存在しており、MpGI-MpFKF 複合体による生長相制御に抑制的に機能している可能性が考えられる。

3. MpGI-MpFKF 複合体はゼニゴケの生長相転換を制御する

gi^{ko}, *fkf^{ko}*はFRを補光した長日条件下で生殖器官形成が起こらない表現型を示した(図10)。このことから、*MpGI*、*MpFKF*がいずれもゼニゴケの生長相転換に必要であることが示された。*MpGI*と*MpFKF*が相互作用することや(図7, 8)、*gi^{ko}*や*fkf^{ko}*背景で他方の遺伝子を過剰発現させた植物体は、*gi^{ko}*および*fkf^{ko}*と同様に、FRを補光した長日条件下で60日以上生育させても生殖器官形成が起こらないことから(図11C)、*MpGI*と*MpFKF*が複合体を形成することが、ゼニゴケの生長相転換に必要であることが示唆された。一方 *MpGI*-FLAG および *MpFKF*-myc の過剰発現系統では、短日条件においても野生株の長日条件とほぼ同じ時期に生殖器官形成がみられた(図11B)。このことから、*MpGI*-*MpFKF* 複合体はゼニゴケの生長相転換を促進することが示唆された。また、*MpGI*-FLAG および *MpFKF*-myc の過剰発現系統では、単独の過剰発現系統でも共過剰発現系統と同程度生長相転換が促進された。単独の過剰発現により共過剰発現と同程度の表現型がみられた原因として、形質転換体の背景となっている野生株において複合体を形成せずに存在している遊離の *MpGI* あるいは *MpFKF* タンパク質が過剰発現させた *MpGI*-FLAG または *MpFKF*-myc タンパク質と相互作用し、複合体形成量が増加した可能性が考えられた。

シロイヌナズナでは、長日条件では *fkf1* 欠損変異体は *gi* 欠損変異体と比べてやや早咲きの表現型を示すため、GI-FKF1 複合体による花成制御以外に、*GI*が *FKF1* 非依存的に花成を制御する経路が存在すると考えられている(Sawa et al., 2007)。そのなかに、*GI*が *miR172* を介して *FT* の転写を制御する経路や(Jung et al., 2007)、*GI*が *FT* 転写抑制因子である *TEMPRANILLO (TEM)* や *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* の機能を阻害する経路が挙げられる(Sawa and Kay, 2011)。また、*FKF1* に関しても、*GI* 非依存的に *CO* タンパク質を直接安定化する機能をもつことが示唆されている(Song et al., 2012)。ゼニゴケの *gi^{ko}* と *fkf^{ko}* は本論文で解析した条件においてはほぼ同じ表現型を示すため、*MpGI* と *MpFKF* が単独で生長相転換を制御する経路は存在しないか、あるとしても寄与が小さいことが予想される。従って、陸上植物の *GI* と *FKF1* による光周性生長相制御機構のうち、最も祖先的な機能は *GI*-*FKF1* 複合体を介した機能であり、上記のような *GI*、*FKF1* 単独の制御機構は、生長相転換の時期を様々な環境に応答してより高度に調節するために、苔類以降の植物種が新たに獲得した機構である可能性が考えられた。

シロイヌナズナの *GI* および *FKF1* の共過剰発現株は、抽苔時のロゼット葉枚数が短日条件と長日条件でほぼ同じになり、日長感受性が完全に失われる表現型を示す(Sawa et al., 2007)。一方、ゼニゴケの *GI^{ox}FKF^{ox}* は、短日条件では長日条件より生殖器官形成が数日程度遅れる表現型を示したため(図11B)、日長感受性が完全に失われていない可能性が考えられた。ただし、本解析におけるゼニゴケの生長相転換の評価は日数を基に行っているため、短日条件と長日条件における生育速度の差が表現型に反映されている可能性も残されている。今後ゼニゴケの生殖器官形成の評価法について、生殖器官形成までの日数とは別に分枝数や杯状体形成数などを利用した系を検討していく必要があると考えられた。

本研究において、MpGI および MpFKF の過剰発現系はすべて、FR を補光しない連続白色光条件では生殖器官形成がみられなかったことから、これらの株では Pfr 型 Mpphy を介した生長相転換抑制は野生株並みに機能していると考えられた（第7項参照）。このことから、ゼニゴケの生長相転換の制御経路のうち、MpPHY を介した経路と MpGI, MpFKF を介した経路は独立しており、これらの経路の統合点は少なくとも MpGI および MpFKF の下流に位置すると考えられた。シロイヌナズナの GI および FKF1 が主に光周性花成経路で機能することを踏まえると、MpGI および MpFKF は、ゼニゴケの光周性生長相制御経路に位置しており、この機構を基にゼニゴケは長日条件を認識して生殖器官形成を行っていると考えられた。

4. MpGI はシロイヌナズナにおいても機能的である

本研究により、MpGI と MpFKF1 がゼニゴケの配偶体世代の生長相転換を制御することが示された（図 10, 11）。さらに、AtGI プロモーター下で発現させた MpGI はシロイヌナズナの *gi* 欠損変異体の花成遅延の表現型を部分的に相補した（図 12）。従って、MpGI はシロイヌナズナにおいても花成制御因子として機能し得ることが示唆された。MpGI は AtGI のすべての機能をもつことを示したのではないことには注意が必要であるものの、本解析により、生長相制御因子としての GI の機能は、陸上植物の進化上保存された機能であることが示唆された。*gi* 欠損変異体の表現型が部分的であった原因としては、AtGI プロモーターで発現させた MpGI の mRNA の発現量が低かったことや、シロイヌナズナ植物体内における MpGI タンパク質の安定性、あるいは相互作用因子との複合体形成能などが AtGI と異なることなどが挙げられる。図 2B に示すように、AtGI と MpGI のアミノ酸配列は、FKF1 や CDF との相互作用に必要な N 末端側および C 末端側領域（Sawa et al., 2007）の相同性は非常に高いのに対し、中央部分はアミノ酸配列の相同性がやや低いため、この領域が 2 種の GI タンパク質の安定性などの差を生み出し、部分相補の結果の一因となった可能性が考えられた。

最近、ヒメツリガネゴケを用いた研究によって、ヒメツリガネゴケの茎葉体（配偶体世代）における組織・器官の発生がシロイヌナズナ（孢子体世代）における発生機構と共通のモジュールにより制御されていることが報告されており（Pires et al., 2013; Xu et al., 2014）、発生の分野においては、配偶体世代における組織分化を制御する分子機構の多くが、孢子体世代へと転用されたことが明らかになりつつある。本研究では、日長依存的なゼニゴケの葉状体（配偶体世代）からの生殖器官形成とシロイヌナズナ（孢子体世代）の花成が、ともに GI 遺伝子に制御される生理応答であることを示した。従って、植物は進化過程において配偶体世代における生殖器官形成機構を孢子体世代へと転用し、それが被子植物の光周性花成制御機構の原形となった可能性が考えられた。今後、MpGI-MpFKF 複合体の下流因子、および孢子体における MpGI、MpFKF の機能を明らかにすることで、陸上植物の生長相制御の進化過程について、新たな知見を得ることができると期待される。

5. *GI*, *FKF1* 遺伝子の獲得は植物の陸上化の時期にさかのぼることができる

これまでの先行研究により、蘚類ヒメツリガネゴケや緑藻クラミドモナス、オストレオコッカスなど、これまでに全ゲノムが解読された藻類および非維管束植物において *GI*, *FKF1* のオルソログは存在しないことが報告されていたため、*GI*, *FKF1* の獲得は維管束獲得の前後であると考えられてきた (Holm et al., 2010)。しかし、本研究により、苔類ゼニゴケの生長相制御機構が MpGI-MpFKF 複合体を介して行われることを明らかにした (図 8, 9, 11, 12)。このことから生長相制御因子としての GI-FKF1 複合体の起源は少なくとも植物の陸上化の時点にさかのぼることができることが明らかとなった。ゼニゴケを含む苔類の生長相転換が明確な日長応答を示すのに対し、蘚類の多くの植物種は日長による生長相制御が明瞭に観察されないことが報告されており (Chopra and Bhatla, 1983)、ヒメツリガネゴケの生長相転換も短日に加えて低温条件が必要であることが報告されている (Hohe et al., 2002)。従って、ヒメツリガネゴケを含む蘚類は種分化の過程で *GI*, *FKF1* 遺伝子を失い、代わりに GI-FKF 複合体によらない独自の光周性生長相制御機構や、温度による制御機構を獲得した可能性が考えられる。

植物は、光周性による生長相制御の機構を発達させることによって季節変化を予測し、生育に不利な季節を孢子などの形態で克服することが可能になった。このことは、水中と比較して気温、湿度などの環境変動が大きい陸上環境への適応に非常に重要であったと考えられる。植物の陸上化に関わる分子機構の変化に関しては、今後陸上植物の祖先種とされている車軸藻類 (Turmel et al., 2003; Qiu et al., 2006; Bowman et al., 2007) のゲノム解読が待たれるものの、GI-FKF1 による生長相制御機構の獲得も、植物の陸上への適応に大きく寄与した要因の 1 つではないかと予想される。

材料と方法

使用した植物体

本研究はゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) の野生型雄株である Takaragaike-1 (Tak-1) と雌株である Takaragaike-2 (Tak-2) および、それらを掛け合わせて得られた F1 胞子と、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生株として Col を用いた。作出したゼニゴケ形質転換体の遺伝的背景を以下に示す。

F1 胞子背景・・・*GIpro:GUS*, *FKFpro:GUS*

gi^{ko}, *GIpro:gGI/gi^{ko}*, *EFpro:MpFKF-4xmyc/gi^{ko}*

fkf^{ko}, *FKFpro:gFKF/fkf^{ko}*, *EFpro:MpGI-3xFLAG/fkf^{ko}*

Tak-1 背景・・・*GI^{ox}*, *FKF^{bx}*, *GI^{ox}FKF^{bx}*

ゼニゴケの培養

ゼニゴケの培養には特に指定のない限り、2 倍に希釈したガンボーク B5 培地 [(Gamborg et al., 1968), 175 mg/L リン酸二水素ナトリウム二水和物、2.5 g/L 硝酸カリウム、134 mg/L 硫酸二アンモニウム、250 mg/L 硫酸マグネシウム七水和物、150 mg/L 塩化カルシウム二水和物、40 mg/L EDTA-NaFe (III)、250 µg/L モリブデン酸ナトリウム二水和物、25 µg/L 硫酸銅七水和物、25 µg/L 塩化コバルト六水和物、2 mg/L 硫酸亜鉛七水和物、10 mg/L 硫酸マンガン七水和物、3 mg/L ホウ酸、750 µg/L ヨウ化カリウム] に 0.5 g/L MES、1.3% (w/v) 寒天末、1% (w/v) ショ糖を加え、KOH で pH5.7 に調整したものに適切な抗生物質を加えて使用し、22°C の連続白色光 (50~60 µmol m⁻² s⁻¹) 照射下で無性的に継代培養した。白色光光源には CCFL (OPT-40C-N-L, Optrom) を用いた。ゼニゴケの生殖器誘導は、連続白色光下で 10 日間生育させた無性芽を 22°C に設定したグロースチャンバー (LH-80CCFL-6CT, NKSystem) に移して行った。グロースチャンバーの光設定条件は、50~60 µmol m⁻² s⁻¹ の CCFL 光源の白色光に、20-30 µmol photons m⁻² s⁻¹ の FR LED (VBL-TFL600-IR730*; Valore; ピーク波長 733 nm, 半値幅 27 nm) を補光した長日条件 (16 時間明期 8 時間暗期)、又は短日条件 (8 時間暗期 16 時間明期) である。

配列の解析

ゼニゴケ時計遺伝子の配列検索は当研究室で作成されたゼニゴケ EST データベースおよびゲノムデータベースを用いた。アミノ酸配列のアラインメント作成は Geneious6.1.6 ソフトウェア (Biomatters; <http://www.geneious.com>) に付属のプログラムである MUSCLE を用い、通常のパラメータ設定により作製した。最尤法による系統樹作製には Geneious に付属の PhyML プログラム (ver. 2.2.038) を用い、LG モデルに基づいて作成した (Guindon and Gascuel, 2003)。アラインメント作成および系統樹作製に用いたアミノ酸配列を以下に示す。

GI

AB872959 (MpGI, *M. polymorpha*), ABP96497 (AtGI, *A. thaliana*), Os01g0182600 (OsGI, *Oryza sativa*), XP_002961231 (SmGI, *S. moellendorffii*)

FKF1/LKP2/ZTL

AB872960 (MpFKF), AAF32298 (AtFKF1), NP_001154783 (AtZTL), NP_849983 (AtLKP2), Os11g0547000 (OsFKF1, *O. sativa*), Os02g0150800 (OsZTL1), Os06g0694000 (OsZTL2), NP_001235886 (GmFKF1, *Glycine max*), NP_001235856 (GmZTL1), NP_001235871 (GmZTL2), ABL11478 (TaFKF1, *Triticum aestivum*), ABR14627 (TaZTL), ACT22762 (AcFKF1, *Allium cepa*), ACT22763 (AcZTL), AAQ73528 (McFKF1, *Mesembryanthemum crystallinum*), AAQ73527 (McZTL), and XP_002974336 (SmFKF)

ゼニゴケの形質転換

ゼニゴケ孢子および葉状体への形質転換は、アグロバクテリウムによる形質転換法を用いて Ishizaki et al., 2008 および Kubota et al., 2013 に従って行った。得られた薬剤耐性株の無性芽を 2 回継代した G2 世代を解析に用いた。*EFpro:MpGI-3xFLAG* および *EFpro:MpFKF-4xmyc* コンストラクトは Tak-1 または *giko*, *fkfko* に、*GIpro:gGI* は *giko* に、*FKFpro:gFKF* は *fkfko* に葉状体の切断面から導入した。それ以外のコンストラクトは F1 孢子に形質転換した。

コンストラクトの作製

***MpGI* および *MpFKF* ジーンターゲティング用コンストラクト (MpGI-GT, MpFKF-GT)**

Tak-1 ゲノム抽出液を鋳型に、相同組み換えののりしろとなる領域を KOD FX Neo (Toyobo) を用いて PCR により増幅した。*MpGI* のターゲティングでは、得られた PCR 産物のうち、5'側ののりしろ領域を pJHY-TMp1 の *PacI* サイト、3'側を *AscI* サイトに導入した。*MpFKF* のターゲティングでは 5'側ののりしろ領域を pJHY-TMp1 の *AscI* サイト、3'側を *PacI* サイトに導入した。用いたプライマー配列を以下に示す。

MpGI (5'側)

F 5'-CTAAGGTAGCGATTAATGCAGGAATAGTAGAGATCATGAAGG-3'

R 5'-CCGGGCAAGCTTTTAATCGTGAAACGATCCCAAATCT-3'

(3'側)

F 5'-AACACTAGTGGCGCGAGCCAAAGAACCGTATCGAA-3'

R 5'-TTATCCCTAGGCGCGTGGCATTCCATTCTATGCTG-3'

MpFKF (5'側)

F 5'-TTATCCCTAGGCGCGCACACTCCGTGCAATCTCAA-3'

R 5'-TAAACTAGTGGCGCGCCACAACGATCCTACCACATC-3'

(3'側)

F 5'-GCCCCGGGCAAGCTTAACCATGGAAGGACTCACTGC-3'

R 5'-CTAAGGTAGCGATTAAGTTCGGACAGCTTCCTTCA-3'

GIpro:GUS, FKFpro:GUS

Tak-1 ゲノム抽出液を鋳型に、*MpGI*の予測翻訳開始点上流 4,573 bp および *MpFKF*の予測翻訳開始点上流 5,082 bp を KOD Plus Neo (Toyobo) を用いて PCR により増幅した。得られた増幅断片を TOPO 反応により pENTR-D-TOPO (Life Technologies) に導入してエントリークローンを作成した。得られたエントリークローンを LR 反応 (Life technologies) により pMpGWB104 (no promoter GUS、石崎公庸博士作製) に導入し目的のプラスミドを得た。用いたプライマー配列を以下に示す。

MpGI プロモーター

F 5'-CACCAGATTTTAGGTTGACTCG-3'

R 5'-GGGAAATGACATAGGGCCAA-3'

MpFKF プロモーター

F 5'-CACCTGACCGTTTAATTCATTGTGGA-3'

R 5'-ACCCAAGGACATATCCGAGT-3'

EFpro:MpGI-3xFLAG, EFpro:MpFKF-4xmyc

Tak-1 の cDNA を鋳型として *MpGI* および *MpFKF* の CDS の終止コドン手前までを KOD Plus Neo を用いて PCR により増幅した。得られた増幅断片を TOPO 反応により pENTR-D-TOPO に導入してエントリークローンを作成した。用いたプライマー配列を以下に示す。

MpGI (CDS stop 無)

F 5'-CACCATGTCATTTCCCGGGCAGAA-3'

R 5'-GACAGGAATCGGGCAGC-3'

MpFKF (CDS stop 無)

F 5'-CACCATGGATTGGGATACAGATACCG-3'

R 5'-GGTGCTAGACAGACTCTTATGTGTTA-3'

EFpro:MpGI-3xFLAG および *EFpro:MpFKF-4xmyc* の作出には以下のバイナリープラスミドを用いた。PCR により合成した 3xFLAG 断片および 4xmyc 断片を pMpGWB103

および 303 の *Aor51HI* サイトに導入し、改変型 pMpGWB103 (303) を作出した (EF promoter C-3xFLAG, EFpromoter C-4xmyc)。このバイナリープラスミドに、前述の *MpGI* および *MpFKF* の CDS 全長がクローニングされたエントリークローンを LR 反応により導入し、目的のプラスミドを得た。

GIpro:gGI, FKFpro:gFKF

Tak-1 ゲノム抽出液を鋳型に、*MpGI* および *MpFKF* のプロモーターから 3'UTR までを含む遺伝子全長を KOD Plus Neo を用いて PCR により増幅した。得られた増幅断片を TOPO 反応により pENTR-D-TOPO に導入してエントリークローンを作成した。得られたエントリークローンは LR 反応により pMpGWB301 (no promoter、石崎公庸博士作製) に導入し目的のプラスミドを得た。用いたプライマー配列を以下に示す。

genomic MpGI

F 5'-CACCGCTATTCTTCACGCCGAAA-3'

R 5'-TCCCCCTTTATTGTTGAACT-3'

genomic MpFKF

F 5'-CACCTGACCGTTTAATTCATTGTGGA-3'

R 5'-GATGGTTTCCCGTACAGGTG-3'

AtGIpro:MpGI

野生型 Col のゲノム抽出液を鋳型に、*AtGI* のプロモーターおよび 5'UTR を含む 2,106 bp を PCR により増幅した。また、*MpGI* の CDS 領域全長を PCR により増幅した。精製した 2 つの増幅断片を鋳型に PCR を行い、2 断片が連結した *AtGIpro:MpGI* の増幅断片を得た。得られた増幅断片を pENTR/D-TOPO に導入し、エントリークローンを作成した。エントリークローンは LR 反応により pGWB1 (no promoter, no tag、Nakagawa et al., 2007) に導入した。使用したプライマーを以下に示す。

AtGI プロモーターおよび 5'UTR

F 5'-CACCTGCCTACAATTTGAGAATACGCC-3'

R 5'-TTCTGCCCGGGAAATGACATCCAGGAACCGAACTAAACCCCAAC-3'

MpGI CDS 全長

F 5'-GGTTTAGTTTCGGTTCCTGGATGTCATTTCCCGGGCAGAAATGGC-3'

R 5'-TTAGACAGGAATCGGGCAGC-3'

ノックアウト株の作出

Ishizaki et al., 2013 に基づき、*gⁱko* および *fk^fko* の作出と選抜を行った。MpGI-GT または MpFKF-GT をアグロバクテリウム法によりゼニゴケ F1 胞子に形質転換した。得られた薬剤耐性株から抽出したゲノム抽出液を鋳型として、相同組み換えにより欠失する領域を標的としたプライマーセットを用いて PCR 反応による 1 次選抜を行った。増幅産物のうち、野生株由来と考えられるサイズの特異的な増幅産物が消失し、*EFpro:hpt* カセットのサイズである 3 kb ほど大きなサイズに特異的な増幅産物がみられた個体を選抜した。これらの個体について、*MpEFpro:hpt* 上に位置するプライマーと、のりしろに用いた相同配列の外側に位置するプライマーを用いて PCR 反応を行い (2 次選抜)、目的のサイズに特異的な増幅がみられた個体をノックアウト株として選抜した。選抜に用いたプライマーを以下に示す。

1 次選抜に用いたプライマー

gⁱko

F 5'-CACCAAAAGTTGGACCGAAT-3'

R 5'-CAGCGTCCCATCAATCACAC-3'

fk^fko

F 5'- TGGATGTAGGTCGAGTTTACCC-3'

R 5'-CCGACGGGAGAACTCTTGTA-3'

2 次選抜に用いたプライマー

相同領域 5'側確認用

gⁱko

F 5'-TAGCAGGAAGGCGTCTGTTC-3'

R 5'-CAACCTTTCTGCAGGCACATC-3'

fk^fko

F: 5'-CAACCTTTCTGCAGGCACATC-3'

F: 5'-CGTCTCCACCAATTTTGCTT-3'

相同領域 3'側確認用

gⁱko

F: 5'-GTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTT-3'

R: 5'-GGTCAACCAATCTCGAGGAA-3'

fk^fko

F: 5'-TGATGGATTACAATGCTTCCAA-3'

R: 5'-GTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTT-3'

RNA の発現量解析

およそ 120 mg のゼニゴケ葉状体から TRIzol (Life Technologies) を用いて付属のプロトコルに従い RNA を抽出した。サンプリングの条件は本文中の記載に従った。暗所条件のサンプリングについては緑色安全光下で行った。得られた RNA を RQ1 RNase free DNase (Promega) を用いて DNase 処理し、エタノール沈殿により回収したのち、4 µg RNA を逆転写に用いた。逆転写反応は 6-mer random primer および Rever Tra Ace (Toyobo) を用いて行い、付属のプロトコルに従った。得られた cDNA を滅菌水でおよそ 4 倍に希釈したものを鋳型として、CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用いて定量的リアルタイム PCR 法により遺伝子発現解析を行った。dsDNA の定量には SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) を用いた。PCR 反応は 95°C 2 min の後 95°C 10sec, プライマーTm 値 15sec, 72°C 15 sec を 40 サイクル行った。増幅産物の特異性は融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動により確認した。解析結果は CFX Manager (Bio-Rad) を用いて定量化した。目的遺伝子の発現量を内部標準として用いた *MpEF* の発現量に対する相対値として算出し、ピーク時の値を 1 に設定した。用いたプライマーの配列と Tm 値を以下に示す。

MpGI (Tm 値: 61.8)

F 5'-CACCAAAAGTTGGACCGAAT-3'

R 5'-CCCAATATCATCCACAAAGG-3'

MpFKF (Tm 値: 54.5)

F 5'-AGATTAGGGACGGGATGGAA-3'

R 5'-GGAAGTCGCCACTCCTGAA-3'

MpEF (Tm 値: 63.2)

F 5'-AAGCCGTCGAAAAGAAGGAG-3'

R 5'-TTCAGGATCGTCCGTTATCC-3'

酵母ツーハイブリッド法による分子間相互作用解析

酵母ツーハイブリッド法は GAL4-based yeast two-hybrid system (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System, Clontech) を用いて行った。*MpGI* の cDNA 全長 (GI FL)、N 末端 (GI N, 1-392 アミノ酸)、C 末端 (GI C, 383-1187 アミノ酸) に対応する領域を GBKT7 ベクター (Clontech) の *EcoRI*-*SaI* サイトに導入した。*MpFKF* の cDNA 全長 (FKF FL)、LOV ドメインと F-box ドメイン (FKF N, 1-291 アミノ酸)、F-box ドメインと Kelch リピート (FKF C, 181-635 アミノ酸) に対応する領域を pGADT7 (Clontech) の *NdeI*-*BamHI* サイトに導入した。相互作用を見たい組み合わせのプラスミドを酢酸リチウム法により酵母 AH109 株に形質転換し、SD-WL 培地 (2% グルコース、Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate 1.7 g/L、硫酸アンモニウム 5 g/L、-Leu, -Trp

mix 0.64 g/L, 2% 寒天) で形質転換体を選抜した。得られたコロニーを SD-WL の液体培地で培養し、滅菌水で希釈系列を作成して等量ずつ SD-WLH (2% グルコース、Yeast nitrogen base w/o amino acid 1.7 g/L、硫酸アンモニウム 5 g/L、-Leu, -Trp -His -Ura mix 0.64 g/L, Uracil 76 mg/L、2% 寒天) 培地上にスポットした。インサートなしの pGBKT7、pGADT7 ベクターをネガティブコントロールとして使用した。28°C で 2、3 日間培養し、SD-WLH 培地上の酵母の生育状態で相互作用を評価した。コンストラクトに使用したプライマーを以下に示す。

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GI FL	ATGCGAATTCATGTCATTTCCCGGGCAGAA	ATGCGTCGACTTAGACAGGAATCGGGCAGC
GI N	ATGCGAATTCATGTCATTTCCCGGGCAGAA	ATGCGTCGACTCAAGCTGCGGCAGCGTCTGCGG
GI C	ATGCGAATTCTCAGGTACCGCCGCAGACGC	ATGCGTCGACTTAGACAGGAATCGGGCAGC
FKF FL	ATGCCATATGATGGATTGGGATACAGATAC	ATGCGGATCCTCAGGTGCTAGACAGACTCT
FKF N	ATGCCATATGATGGATTGGGATACAGATAC	ATGCGGATCCTCATTTCTCTTGCAAGTCTGCCCC
FKF C	ATGCCATATGCCAATACCATGGAAGGACTC	ATGCGGATCCTCAGGTGCTAGACAGACTCT

ゼニゴケ植物体の GUS 染色

ショ糖を含むガンボグ培地上で連続白色光下で 10 日間培養した *MpGIpro::GUS*, *MpFKFpro::GUS* 発現株を、染色液 (50 mM リン酸ナトリウム pH 7.2、0.5 mM ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム、0.5 mM ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム、10 mM EDTA、0.01% Triton X-100、1 mM X-Gluc) に浸け、15 分間減圧を行った後 37°C オーバーナイトでインキュベートし、染色を行った。酵素反応後、70% エタノールでクロロフィル除去を行った後、実体顕微鏡を用いて観察した。

In vivo 共免疫沈降法

GI^{ox} および *GI^{ox} FKF^{bx}* 株を LL で 10 日間生育後、FR 補光した長日条件に移動して 7 日間培養して、18 日目の ZT12 にサンプリングを行った。およそ 500 mg の植物体を液体窒素で凍結した後破碎し、1 mL の氷冷した IP バッファー [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol, 50 µM MG-132, cOmplete protease inhibitor (Roche)] を加えて溶解した。3,500 g で 2 分間、次に 16,400 g で 10 分間遠心し細胞残渣を取り除いた後、およそ 5 mg のタンパク質を含む全タンパク質画分に対して 50 µl の myc 抗体付きマイクロビーズ (Miltenyi Biotech) と混合して、氷上で減圧しながら 30 分間インキュベートして免疫沈降を行った。その後、磁石台に設置した µColumns (Miltenyi Biotech) にビーズ入り全タンパク質画分を通してビーズをカラムに吸着させた。カラムを 200 µl の IP バッファーで 10 回、150 µl の Wash Buffer2 (Miltenyi Biotech) で 1 回洗浄後、90 µl の 2x サンプルバッファー [60 mM Tris-HCl pH 6.8,

5% SDS, 20% (v/v) glycerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol] で溶出し、吸着画分を得た。

ウェスタンブロット解析

タンパク質溶液を 8% SDS-PAGE でサイズ分画し、電気ブロット法で PVDF メンブレンにタンパク質の転写を行った。1 次抗体反応は、10,000 希釈した FLAG 抗体 [anti-FLAG M2 IgG antibody (F1804, Sigma-Aldrich)]、あるいは 500 倍希釈した myc 抗体 [anti-c-Myc IgG antibody (014-21901, Wako Pure Chemical Industries)] で行った。2 次抗体反応は 10,000 倍希釈したマウス IgG 抗体 [horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG (NA931, GE Healthcare)] で行った。検出には ECL 法 [horseradish peroxidase-based ECL Plus reagent (GE Healthcare)] を用い、Image Quant LAS 4010 biomolecular imager (GE Healthcare) で化学発光を検出した。

シロイヌナズナの形質転換

作製したコンストラクト *AtGIp^{ro}:MpGI* をシロイヌナズナ *gi-2* 変異体 (Fowler et al., 1999) に減圧浸潤法により形質転換し、薬剤耐性を指標に T1 種子の選抜を行った。*gi-2* の種子は遠藤求博士 (京都大学) よりご分与いただいた。

シロイヌナズナの花成時期の測定

AtGIp^{ro}:MpGI を 1 コピーもつ T3 ホモのラインの種子を 16 時間明期 8 時間暗期、22°C に設定したグロースチャンバー内 (LH300, NKSsystem) で生育した。光源には 90 から 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯 (FL40SSEX-N/37-HG, NEC Lighting) を用いた。花成時期の評価は抽臺時のロゼット葉を指標に行った。

結論

本研究では、陸上植物における日長依存的な生長相制御機構の原形と進化過程を解明するために、基部陸上植物ゼニゴケに着目し、ゼニゴケの日長依存的な生長相制御の分子機構の解明を試みた。

まず、ゼニゴケゲノムデータベースを用いて、被子植物の光周性花成経路において主要な役割をもつ *GI*、*FKF1* 遺伝子に相同性を示す配列 (*MpGI* および *MpFKF*) がゼニゴケゲノム上に 1 分子種ずつ存在することを見出した。*MpGI* および *MpFKF* の一次構造解析および系統解析により、*MpGI* および *MpFKF* が *GI* および *FKF1/LKP2/ZTL* のオルソログである可能性が示唆された (図 2-4)。蘚類ヒメツリガネゴケや藻類では *GI*・*FKF1* ホモログが存在しないため、これまで *GI* と *FKF1* の獲得は維管束獲得後であると考えられてきたが、本研究により、これらの因子の起源が植物の陸上化の時期にさかのぼることができることが初めて明らかとなった。*MpGI* および *MpFKF* の発現は概日時計によって制御されており、ともに夕暮れの時間帯に発現ピークを迎えることが示された (図 5)。発現組織解析では、*MpGI* と *MpFKF* が葉状体のメリステムから中肋にかけていずれも発現していることが明らかとなった (図 6)。酵母ツーハイブリッド法および共免疫沈降法を用いた解析により、*MpGI* と *MpFKF* は相互作用することが示された (図 7, 8)。このことから、ゼニゴケ葉状体において *MpGI*-*MpFKF* 複合体が夕方の時間帯に多く蓄積していることが示唆された。

次に、*MpGI* と *MpFKF* のノックアウト株 *gi^{ko}*、*fkf^{ko}* を作出し、生長相転換の時期を解析した。その結果、野生株で観察された長日条件下の生殖器形成が、*gi^{ko}*、*fkf^{ko}* では完全に抑制された (図 10)。このことから *MpGI* および *MpFKF* が、ゼニゴケの生長相転換に必要であることが示唆された。また、野生株背景で *MpGI* と *MpFKF* を過剰発現させた植物体では、野生株で生殖器形成がみられない短日条件においても生殖器形成がみられた (図 11)。一方で *gi^{ko}* 背景で *MpFKF* を、あるいは *fkf^{ko}* 背景で *MpGI* を過剰発現させた株では、*gi^{ko}*、*fkf^{ko}* 同様に生殖器は形成されなかった (図 11)。これらより、*MpGI*-*MpFKF* 複合体の形成がゼニゴケの生長相転換に必要であること、また、*MpGI*-*MpFKF* 複合体がゼニゴケの生長相転換を促進することが示唆された。さらに、*MpGI* または *MpFKF* の単独の過剰発現は、*MpGI* および *MpFKF* の共過剰発現と比較して、ほぼ同時期に生殖器形成が観察された (図 11)。このことから、*MpGI* および *MpFKF* が同一経路で機能することが示唆された。ただし *MpGI*、*MpFKF* 過剰発現系統は野生株同様、遠赤色光を補光しない連続白色光条件では生殖器形成を起こさない。従ってゼニゴケの生長相制御は、日長と光質を介した独立した経路によって制御されており、これら経路の統合点は *MpGI* および *MpFKF* の下流に位置すると考えられた (図 13)。

さらに、*MpGI* はシロイヌナズナ *gi* 変異体の遅咲きの表現型を部分的に相補できることから、*MpGI* は孢子体世代において生長相制御因子として機能し得ることが示唆された (図

12)。従って、生長相制御因子としての *GI* 遺伝子の機能は、陸上植物の進化上保存されていると考えられ、日長依存的なゼニゴケの葉状体（配偶体世代）からの生殖器官形成とシロイヌナズナ（孢子体世代）の花成が、ともに *GI* 遺伝子に制御される生理応答であることが示唆された。

以上の結果より、植物は陸上化の時点で概日時計から *GI*-*FKF1* 複合体を介した生長相制御機構を獲得しており、この機構が陸上植物の進化過程において配偶体世代から孢子体世代へと転用されたことが示唆された（図 13）。

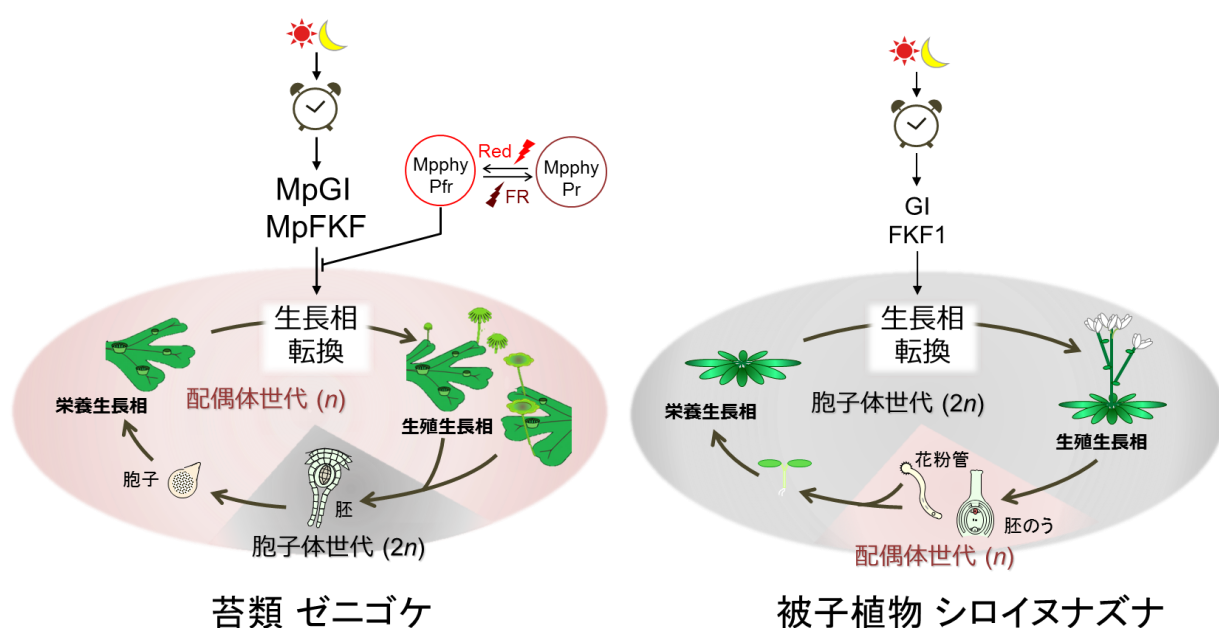


図 13 陸上植物の光周性生長相制御機構の転用

概日時計から *GI*-*FKF1* 複合体を介した生長相制御機構は、配偶体世代（ゼニゴケ）から孢子体世代（シロイヌナズナ）へ転用されたと考えられる。

引用文献

- Alabadi, D., Yanovsky, M.J., Mas, P., Harmer, S.L., and Kay, S.A. (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**, 757-761.
- Aoki, S., Ichikawa, K., Katoh, S., and Shimizu, M. (2004). Circadian expression of the *Lhcb2* gene encoding a major light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 68-76.
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.H., Tobin, E.M., Kay, S.A., and Imaizumi, T. (2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control *Arabidopsis* clock progression. *Plant Cell* **22**, 606-622.
- Bendix, C., Mendoza, J.M., Stanley, D.N., Meeley, R., and Harmon, F.G. (2013). The circadian clock-associated gene *gigantea1* affects maize developmental transitions. *Plant Cell Environ.* **36**, 1379-1390.
- Benson-Evans, K. (1961). Environmental factors and bryophytes. *Nature* **191**, 255-260.
- Benson-Evans, K. (1964). Physiology of the reproduction of bryophytes. *Bryologist* **67**, 431-445.
- Bowman, J.L., Floyd, S.K., and Sakakibara, K. (2007). Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* **129**, 229-234.
- Bruce, V.G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **70**, 537-548.
- Chiyoda, S., Ishizaki, K., Kataoka, H., Yamato, K.T., and Kohchi, T. (2008). Direct transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. by particle bombardment using immature thalli developing from spores. *Plant Cell Rep.* **27**, 1467-1473.
- Chiyoda, S., Linley, P.J., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., Yokota, A., and Kohchi, T. (2007). Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Res.* **16**, 41-49.
- Chopra, R.N., and Bhatla, S.C. (1983). Regulation of gametangial formation in bryophytes. *Bot. Rev.* **49**, 29-63.
- Chow, B.Y., Helfer, A., Nusinow, D.A., and Kay, S.A. (2012). ELF3 recruitment to the *PRR9* promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Signal. Behav.* **7**, 170-173.

- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Corellou, F., Schwartz, C., Motta, J.P., Djouani-Tahri el, B., Sanchez, F., and Bouget, F.Y. (2009). Clocks in the green lineage: comparative functional analysis of the circadian architecture of the picoeukaryote *Ostreococcus*. *Plant Cell* **21**, 3436-3449.
- Dai, S., Wei, X., Pei, L., Thompson, R.L., Liu, Y., Heard, J.E., Ruff, T.G., and Beachy, R.N. (2011). BROTHER OF LUX ARRHYTHMO is a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **23**, 961-972.
- de Montaigu, A., Toth, R., and Coupland, G. (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends Genet.* **26**, 296-306.
- Farre, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2005). Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.* **15**, 47-54.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Ruhl, M., Jarillo, J.A., and Coupland, G. (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* **17**, 75-86.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Coupland, G., and Putterill, J. (1999). *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* **18**, 4679-4688.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Garner, W.W., and Allard, H.A. (1920). Effect of relative length of day and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Mon. Wea. Rev.* **48**, 415.
- Gould, P.D., Locke, J.C., Larue, C., Southern, M.M., Davis, S.J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A.J., and Hall, A. (2006). The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **18**, 1177-1187.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**, 696-704.
- Hayama, R., Izawa, T., and Shimamoto, K. (2002). Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol.* **43**, 494-504.

- Hazen, S.P., Schultz, T.F., Pruneda-Paz, J.L., Borevitz, J.O., Ecker, J.R., and Kay, S.A. (2005). *LUXARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 10387-10392.
- Hecht, V., Knowles, C.L., Vander Schoor, J.K., Liew, L.C., Jones, S.E., Lambert, M.J., and Weller, J.L. (2007). Pea *LATE BLOOMER1* is a *GIGANTEA* ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant Physiol.* **144**, 648-661.
- Hedman, H., Kallman, T., and Lagercrantz, U. (2009). Early evolution of the MFT-like gene family in plants. *Plant Mol. Biol.* **70**, 359-369.
- Helfer, A., Nusinow, D.A., Chow, B.Y., Gehrke, A.R., Bulyk, M.L., and Kay, S.A. (2011). *LUX ARRHYTHMO* encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Curr. Biol.* **21**, 126-133.
- Higuchi, Y., Sage-Ono, K., Sasaki, R., Ohtsuki, N., Hoshino, A., Iida, S., Kamada, H., and Ono, M. (2011). Constitutive expression of the *GIGANTEA* ortholog affects circadian rhythms and suppresses one-shot induction of flowering in *Pharbitis nil*, a typical short-day plant. *Plant Cell Physiol.* **52**, 638-650.
- Hohe, A., Rensing, S.A., Mildner, M., Lang, D., and Reski, R. (2002). Day length and temperature strongly influence sexual reproduction and expression of a novel MADS-Box gene in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.* **4**, 595-602.
- Holm, K., Kallman, T., Gyllenstrand, N., Hedman, H., and Lagercrantz, U. (2010). Does the core circadian clock in the moss *Physcomitrella patens* (Bryophyta) comprise a single loop? *BMC Plant Biol.* **10**, 109.
- Hong, S.Y., Lee, S., Seo, P.J., Yang, M.S., and Park, C.M. (2010). Identification and molecular characterization of a *Brachypodium distachyon* *GIGANTEA* gene: functional conservation in monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* **72**, 485-497.
- Huq, E., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (2000). *GIGANTEA* is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 9789-9794.
- Ichikawa, K., Sugita, M., Imaizumi, T., Wada, M., and Aoki, S. (2004). Differential expression on a daily basis of plastid sigma factor genes from the moss *Physcomitrella patens*. Regulatory interactions among *PpSig5*, the circadian clock, and blue light signaling mediated by cryptochromes. *Plant Physiol.* **136**, 4285-4298.
- Ichikawa, K., Shimizu, A., Okada, R., Satbhai, S.B., and Aoki, S. (2008). The plastid sigma factor SIG5 is involved in the diurnal regulation of the chloroplast gene *psbD* in the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett.* **582**, 405-409.
- Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., and Kay, S.A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 302-306.

- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., and Kay, S.A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 293-297.
- Ishizaki, K., Chiyoda, S., Yamato, K.T., and Kohchi, T.** (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1084-1091.
- Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., and Kohchi, T.** (2013). Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.* **3**, 1532.
- Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H., and Park, C.M.** (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2736-2748.
- Kikis, E.A., Khanna, R., and Quail, P.H.** (2005). ELF4 is a phytochrome-regulated component of a negative-feedback loop involving the central oscillator components CCA1 and LHY. *Plant J.* **44**, 300-313.
- Kim, J., Kim, Y., Yeom, M., Kim, J.H., and Nam, H.G.** (2008). FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **20**, 307-319.
- Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., and Somers, D.E.** (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356-360.
- Kim, W.Y., Ali, Z., Park, H.J., Park, S.J., Cha, J.Y., Perez-Hormaeche, J., Quintero, F.J., Shin, G., Kim, M.R., Qiang, Z., Ning, L., Park, H.C., Lee, S.Y., Bressan, R.A., Pardo, J.M., Bohnert, H.J., and Yun, D.J.** (2013). Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **4**, 1352.
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T.** (2013). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 167-172.
- Li, F., Zhang, X., Hu, R., Wu, F., Ma, J., Meng, Y., and Fu, Y.** (2013). Identification and molecular characterization of *FKF1* and *GI* homologous genes in soybean. *PLoS One* **8**, e79036.
- Li, G., Siddiqui, H., Teng, Y., Lin, R., Wan, X.Y., Li, J., Lau, O.S., Ouyang, X., Dai, M., Wan, J., Devlin, P.F., Deng, X.W., and Wang, H.** (2011). Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **13**, 616-622.
- Mas, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., and Kay, S.A.** (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**, 567-570.

- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., and Ishiura, M.** (2008). A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev.* **22**, 918-930.
- McClung, C.R.** (2013). Beyond *Arabidopsis*: The circadian clock in non-model plant species. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 430-436.
- Moulager, M., Corellou, F., Verge, V., Escande, M.L., and Bouget, F.Y.** (2010). Integration of light signals by the retinoblastoma pathway in the control of S phase entry in the picophytoplanktonic cell *Ostreococcus*. *PLoS Genet.* **6**, e1000957.
- Moulager, M., Monnier, A., Jesson, B., Bouvet, R., Mosser, J., Schwartz, C., Garnier, L., Corellou, F., and Bouget, F.Y.** (2007). Light-dependent regulation of cell division in *Ostreococcus*: evidence for a major transcriptional input. *Plant Physiol.* **144**, 1360-1369.
- Nagai, J., Yamato, K.T., Sakaida, M., Yoda, H., Fukuzawa, H., and Ohyama, K.** (1999). Expressed sequence tags from immature female sexual organ of a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *DNA Res.* **6**, 1-11.
- Nagel, D.H., and Kay, S.A.** (2012). Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Curr. Biol.* **22**, R648-R657.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 34-41.
- Nakamichi, N.** (2011). Molecular mechanisms underlying the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1709-1718.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N.H., and Sakakibara, H.** (2010). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **22**, 594-605.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B.** (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 331-340.
- Nishiyama, R., Yamato, K.T., Miura, K., Sakaida, M., Okada, S., Kono, K., Takahama, M., Sone, T., Takenaka, M., Fukuzawa, H., and Ohyama, K.** (2000). Comparison of expressed sequence tags from male and female sexual organs of *Marchantia polymorpha*. *DNA Res.* **7**, 165-174.

- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., and Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1645-1658.
- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farre, E.M., and Kay, S.A. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**, 398-402.
- Okada, R., Satbhai, S.B., and Aoki, S. (2009a). Photoperiod-dependent regulation of cell growth by *PpCCA1a* and *PpCCA1b* genes encoding single-myb clock proteins in the moss *Physcomitrella patens*. *Genes Genet. Syst.* **84**, 379-384.
- Okada, R., Kondo, S., Satbhai, S.B., Yamaguchi, N., Tsukuda, M., and Aoki, S. (2009b). Functional characterization of *CCA1/LHY* homolog genes, *PpCCA1a* and *PpCCA1b*, in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* **60**, 551-563.
- Onai, K., and Ishiura, M. (2005). *PHYTOCLOCK 1* encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells* **10**, 963-972.
- Park, D.H., Somers, D.E., Kim, Y.S., Choy, Y.H., Lim, H.K., Soh, M.S., Kim, H.J., Kay, S.A., and Nam, H.G. (1999). Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* *GIGANTEA* gene. *Science* **285**, 1579-1582.
- Pires, N.D., Yi, K., Breuninger, H., Catarino, B., Menand, B., and Dolan, L. (2013). Recruitment and remodeling of an ancient gene regulatory network during land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **110**, 9571-9576.
- Pokhilko, A., Mas, P., and Millar, A.J. (2013). Modelling the widespread effects of TOC1 signalling on the plant circadian clock and its outputs. *BMC Systems Biology* **7**, 23.
- Pokhilko, A., Fernandez, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J., and Millar, A.J. (2012). The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 574.
- Qiu, Y.L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., and Davis, C.C. (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 15511-15516.
- Rawat, R., Takahashi, N., Hsu, P.Y., Jones, M.A., Schwartz, J., Salemi, M.R., Phinney, B.S., and Harmer, S.L. (2011). REVEILLE8 and PSEUDO-REPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the *Arabidopsis* circadian clock. *PLoS Genet.* **7**, e1001350.

- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. (2013). *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*. *Plant Physiol.* **162**, 1706-1719.
- Sawa, M., and Kay, S.A. (2011). *GIGANTEA* directly activates *Flowering Locus T* in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, 11698-11703.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., and Imaizumi, T. (2007). FKF1 and *GIGANTEA* complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**, 261-265.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2659-2670.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A. (2000). *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 319-329.
- Song, Y.H., Ito, S., and Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci.* **18**, 575-583.
- Song, Y.H., Smith, R.W., To, B.J., Millar, A.J., and Imaizumi, T. (2012). FKF1 conveys timing information for *CONSTANS* stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**, 1045-1049.
- Sugano, S.S., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., and Kohchi, T. (2014). CRISPR/Cas9 Mediated Targeted Mutagenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **55**, 475-481.
- Takenaka, M., Yamaoka, S., Hanajiri, T., Shimizu-Ueda, Y., Yamato, K.T., Fukuzawa, H., and Ohyama, K. (2000). Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Transgenic Res.* **9**, 179-185.
- Taylor, A., Massiah, A.J., and Thomas, B. (2010). Conservation of *Arabidopsis thaliana* photoperiodic flowering time genes in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Physiol.* **51**, 1638-1647.
- Troein, C., Corellou, F., Dixon, L.E., van Ooijen, G., O'Neill, J.S., Bouget, F.Y., and Millar, A.J. (2011). Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. *Plant J.* **66**, 375-385.
- True, J.R., and Carroll, S.B. (2002). Gene co-option in physiological and morphological evolution. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 53-80.
- Tsuboyama, S., and Kodama, Y. (2014). AgarTrap: a simplified *Agrobacterium*-mediated transformation method for sporelings of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **55**, 229-236.

- Turmel, M., Otis, C., and Lemieux, C.** (2003). The mitochondrial genome of *Chara vulgaris*: insights into the mitochondrial DNA architecture of the last common ancestor of green algae and land plants. *Plant Cell* **15**, 1888-1903.
- Voth, P.D., and Hamner, K.C.** (1940). Responses of *Marchantia polymorpha* to nutrient supply and photoperiod. *Bot. Gaz.* **102**, 169-205.
- Wang, Y., Wu, J.F., Nakamichi, N., Sakakibara, H., Nam, H.G., and Wu, S.H.** (2011). LIGHT-REGULATED WD1 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR9 form a positive feedback regulatory loop in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **23**, 486-498.
- Wann, F.B.** (1925). Some of the factors involved in the sexual reproduction of *Marchantia polymorpha*. *Am. J. Bot.* **12**, 307-318.
- Watanabe, S., Xia, Z., Hideshima, R., Tsubokura, Y., Sato, S., Yamanaka, N., Takahashi, R., Anai, T., Tabata, S., Kitamura, K., and Harada, K.** (2011). A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics* **188**, 395-407.
- Wu, J.F., Wang, Y., and Wu, S.H.** (2008). Two new clock proteins, LWD1 and LWD2, regulate *Arabidopsis* photoperiodic flowering. *Plant Physiol.* **148**, 948-959.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., Murata, T., Kurata, T., Yoneda, A., Kato, K., Hasebe, M., and Demura, T.** (2014). Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. *Science* **343**, 1505-1508.
- Yu, J.W., Rubio, V., Lee, N.Y., Bai, S., Lee, S.Y., Kim, S.S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M.L., Sullivan, J.A., Zhang, Y., Lee, I., Xie, Q., Paek, N.C., and Deng, X.W.** (2008). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol. Cell* **32**, 617-630.
- Zhao, X.Y., Liu, M.S., Li, J.R., Guan, C.M., and Zhang, X.S.** (2005). The wheat *TaGI1*, involved in photoperiodic flowering, encodes an *Arabidopsis GI* ortholog. *Plant Mol. Biol.* **58**, 53-64.

京都大学生命科学研究科修士論文

片岡秀夫 (2007) 苔類ゼニゴケフィトクロムの単離同定と機能解析

久保田茜 (2010) 苔類ゼニゴケにおける青色光応答の探索と

青色光受容体クリプトクロムの発現解析

小松愛乃 (2010) 苔類ゼニゴケにおける青色光応答及び

青色光受容体フォトトロピン遺伝子の解析

保坂将志 (2010) 苔類ゼニゴケを用いたフィトクロムを介する細胞応答の調節機構の解析

論文目録

Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution.

Akane Kubota, Shogo Kita, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Katsuyuki T. Yamato, Takayuki Kohchi

Nature Communications **5**: 3668 doi: 10.1038/ncomms4668, 2014 年

参考文献

Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli.

Akane Kubota*, Kimitsune Ishizaki*, Masashi Hosaka, Takayuki Kohchi

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **77** (1): pp167-172, 2013 年

* These authors contributed equally to this work

シロイヌナズナとゼニゴケにおける概日時計と光周性

遠藤求、久保田茜、河内孝之、荒木崇

植物の生長調節, **49** (1), pp49-58, 2014 年

謝辞

本研究は京都大学生命科学研究科、遺伝子特性学分野の河内孝之教授のもとで行われました。長年にわたり、河内孝之教授からは、研究面および生活面にわたるまで、多くのご指導ご鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、石崎公庸准教授（現神戸大学理学研究科、前京都大学生命科学研究科）、大和勝幸准教授（現近畿大学生物理工学部）、西浜竜一講師、山岡尚平助教、末次憲之助教にはセミナーやミーティングの場を中心に、多くのご助言をいただきました。また、論文執筆にあたり、多くのご指導とご提言をいただきました。心より感謝いたします。

また、荒木崇教授（京都大学生命科学研究科）、遠藤剛准教授（京都大学生命科学研究科）には、副指導教員として多くのご助言をいただきました。また、福澤秀哉教授には、当研究室ご在籍中にセミナーの場を通して多くのご助言をいただきました。深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、シロイヌナズナの *gi-2* 欠損変異体の種子は遠藤求助教（京都大学生命科学研究科）、シロイヌナズナの形質転換に用いたバイナリーベクターは中川強教授（島根大学生物資源科学研究科）よりご分与いただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者である喜多祥吾さん、永山啓太郎さんには、研究を進めるにあたり多くのご協力をいただきました。特に喜多祥吾さんには、修士課程在籍時を通して、自身の健康と睡眠時間を犠牲にしながらも研究にご協力いただきました。心から感謝します。また、石田咲子教務補佐員、松田頼子教務補佐員（ともに生命科学研究科 遺伝子特性学分野）にはゼミゴケ形質転換体の作出にご協力いただきました。形質転換体なくしては本研究が進むことはありませんでした。心からお礼申し上げます。

本研究が行われました京都大学生命科学研究科 遺伝子特性学分野の皆様には、研究生活を通して多くのご助言、ご協力、ご支援をいただきました。特に白川一博士、安居佑季子博士、山野隆志助教には、日々議論の場を設けていただき、公私にわたりご支援をいただきました。論文執筆に際して、白川一博士には、的確なご助言とご指摘をいただきました。心から感謝いたします。この場には書ききれませんが、研究室メンバーの皆様には頭が上がりません。

本研究は日本学術振興会より特別研究員としてのサポートをいただきました。感謝いたします。

最後に、これまで自分を支え、見守ってくれた家族と、日々元気を与えてくれた友人に心から感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Akane Kubota, Shogo Kita, Kimitsune Ishizaki, Ryuichi Nishihama, Katsuyuki T. Yamato, and Takayuki Kohchi

Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution.

Nature Communications **5** (3668), doi: 10.1038/ncomms4668, 2014

<http://www.nature.com/ncomms/2014/140422/ncomms4668/full/ncomms4668.html>

2014 年 5 月

久保田 茜